

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**“La fusión entre células tumorales y
monocitos: una explicación para la
metástasis”**

Tesis doctoral

José Germán Casas Martín

Madrid, 2017

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

“La fusión entre células tumorales y monocitos: una explicación para la metástasis”

José Germán Casas Martín
Licenciado en Biología

Directores:

Dr. Eduardo Manuel López-Collazo

Dr. Luis Augusto Aguirre Pérez

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ

Hospital Universitario la Paz

EDUARDO MANUEL LÓPEZ COLLAZO, DOCTOR EN FARMACIA E INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ, IdiPAZ, Y **LUIS AUGUSTO AGUIRRE PEREZ**, DOCTOR EN BIOQUIMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ, IdiPAZ.

CERTIFICAN

Que el trabajo que presenta don, **JOSÉ GERMÁN CASAS MARTÍN**, titulado “La fusión entre células tumorales y monocitos: una explicación para la metástasis”, ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que reúne los requisitos de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser presentado como Memoria de Tesis Doctoral.

MADRID 28 DE SEPTIEMBRE DE 2017

EDUARDO MANUEL LÓPEZ-COLLAZO

LUÍS AUGUSTO AGUIRRE PÉREZ

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis Eduardo y Luis, ya que sin ellos no habría sido posible este trabajo. Quiero agradecer a Eduardo la oportunidad que me brindó en 2015 para trabajar en su laboratorio, siendo esta tesis uno de sus múltiples frutos. Gracias por todo lo que he aprendido tanto en ciencia como fuera de ella.

A mis padres, a los cuales les debo lo que soy y seré, gracias por vuestro apoyo incondicional y perseverancia. Este trabajo también es vuestro.

A mi hermana, todo consejo siempre es bienvenido.

A Paul, sin ti este camino no habría sido lo mismo, por estar siempre a mi lado, por ofrecerme todo tu apoyo.

A Denco, que tantas veces me has escuchado y has estado a mi lado.

Gracias a mis amigos, que habéis estado siempre para lo bueno y para lo malo, que habéis vivido el recorrido de esta tesis, y me habéis ofrecido vuestro apoyo y ayuda.

Gracias a todos mis compañeros de trabajo, tanto dentro como fuera del grupo, tanto los que están como los que se han ido, este camino ha sido inmejorable gracias a vosotros. Especialmente a Aníbal, Víctor y Paloma, que siempre habéis estado ahí, para toda ayuda laboral y personal.

“El sabio puede cambiar de opinión. El necio, nunca.”

Immanuel Kant (1724-1804)

RESUMEN

En 2016 el número de nuevos casos de cáncer en el mundo ronda los 14 millones anuales, con perspectivas de elevarse a 22 millones durante las próximas dos décadas. Según la Sociedad Americana del Cáncer, el cáncer de pulmón es el más común y el que mayor número de muertes provoca anualmente, sólo por detrás de los accidentes cerebro-vasculares. La gran mayoría de estas muertes se debe a la metástasis, un proceso cuyo mecanismo sigue siendo un enigma a pesar del enorme esfuerzo científico desplegado en su estudio.

En este trabajo hemos estudiado la metástasis a la luz de la centenaria teoría de la fusión celular. Para ello comenzamos comparando la expresión de biomarcadores en muestras de pacientes de pulmón con y sin metástasis, detectando que el receptor CD36 se asocia a un mal pronóstico y se expresa en los dos tipos celulares fundamentales de la masa tumoral: las células tumorales y los componentes del sistema inmune, excelentes candidatos para el desarrollo de la teoría. Encontramos que las células madre tumorales (CSCs) y los monocitos/macrófagos (Mos) pueden fusionarse *in vitro*, produciendo aproximadamente un 7% de células híbridas. Estos híbridos fueron caracterizados morfológica y funcionalmente, detectándose marcas distintivas del cáncer involucradas en la progresión tumoral como una mayor capacidad de invasión y migración en modelos *in vivo* en ratones.

Por otra parte, demostramos *in vitro* que esta fusión depende tanto de la expresión de CD36 por las CSCs como de la polarización y el estado oxidativo de los Mos, de manera que los Mos altamente oxidados y con fenotipo M2 muestran la mayor capacidad de fusionarse con las CSCs. Este mecanismo involucra la competición sinérgica por las LDL (sustrato de CD36) entre los dos tipos celulares (Mos y CSCs) y la modulación del microambiente tumoral por parte de metabolitos intermediarios como el lactato.

Finalmente, reportamos un patrón de biomarcadores característico de estos híbridos (CD36⁺CD14⁺PANK⁺) que nos ha permitido su seguimiento y detección en pacientes de cáncer de pulmón, tanto en células del torrente sanguíneo como en muestras de tumor primario y su correspondiente secundario, demostrando la importancia de los mismos en el proceso metastático.

Nuestros resultados avalan la teoría de fusión celular para explicar la metástasis y abren una nueva vía de investigación en este campo.

ABSTRACT

According to recent data, the number of new cancer cases reaches to about 14 million annually, which is expected to rise up to 22 million during the upcoming decades. Lung cancer is the most common and leads to the highest number of deaths annually, second only to cerebral-vascular accidents. The majority of these deaths are a result of metastasis, a process whose mechanism continues to be unknown despite the enormous scientific efforts which have unfolded throughout the decades.

In this study, we have researched metastasis from the perspective of the centenary Cellular Fusion Theory. To do so we have started comparing the biomarkers' expression in lungs from patients with and without metastasis, detecting that the CD36 receptor is associated with a bad prognostic and is expressed in the two fundamental tumour types: tumoral cells and the components of the immune system, which are excellent candidates for the theory's development. Additionally, we have found that the Cancer Stem Cells (CSCs) and the monocytes/macrophages (Mos) can fuse *in vitro*, producing approximately 7% of hybrid cells. These hybrids were morphologically and functionally characterized, detecting that the acquired properties from their parental cells transmits to them distinctive cancer hallmarks involved in tumoral progression, such as major invasion capacity and murine model migration *in vivo*.

We have demonstrated *in vitro* that this fusion depends not only on CD36 expression from the CSCs but also polarization and the oxidative state of the Mos, so that the highly oxidized Mos and the M2 phenotype show the major fusion capacity with CSCs. This mechanism involves the synergic competition through the LDL (CD36 substratum) between the two cell types and the microenvironment tumoral modulation on behalf of intermediary metabolites such as lactate.

Finally, we generated a pattern of characteristic biomarkers of these hybrids (CD36⁺CD14⁺PANK⁺) which has permitted us to follow and detect lung cancer in patients, in both bloodstream cells and secondary tumour samples, demonstrating the importance of the hybrids in the metastatic process.

Our analyses support the Cellular Fusion Theory in explaining metastasis as well as open a new research track in this pathology.

INDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	13
ÍNDICE DE TABLAS	17
ÍNDICE DE FIGURAS	18
ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN	21
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 El cáncer	23
1.1.1 Generalidades	23
1.1.2 Epidemiología	23
1.1.3 Cáncer de pulmón	24
1.2 Bases fisiológicas de la patología	29
1.2.1 Células troncales del cáncer	29
1.2.2 Marcas distintivas.....	30
1.2.3 Metástasis	32
1.3 El sistema inmunológico.....	33
1.3.1 Monocitos	34
1.3.2 Linfocitos	35
1.3.3 Sistema inmune y cáncer	37
1.4 Fusión celular	38
1.4.1 Fusión celular y cáncer	39
1.4.2. Fusógenos.....	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
2. Hipótesis y objetivos	45
2.1 Hipótesis.....	45
2.2 Objetivos	45
MATERIAL Y MÉTODOS	47
3. Material y métodos	49
3.1 Reactivos	49
3.2 Análisis in silico de la expresión del gen CD36	49
3.3 Cultivos celulares.....	49
3.4 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA	50

3.5 PCR cuantitativa a tiempo real.....	50
3.6 Análisis por citometría de flujo	52
3.7 Recogida, aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica	53
3.8 Fusión con polietilenglicol.....	53
3.9 Co-cultivo de líneas celulares.....	53
3.10 Análisis de imagen por microscopías de fluorescencia y confocal	53
3.11 Colorantes vitales	54
3.12 Análisis de invasión	54
3.13 Análisis de capacidad formadora de tumores.....	55
3.14 Estudio in vivo en ratones	55
3.15 Ensayo de citotoxicidad y perforina	55
3.16 Protocolo y análisis de RNA-seq.....	56
3.17 Cariotipado celular	56
3.18 Estudio de inhibición con siRNA.....	57
3.19 Estudio de inhibición con anticuerpos	57
3.20 Estudio de sobreexpresión con 4HNE	57
3.21 Estudios de sobreexpresión	57
3.22 Tratamientos de cultivos celulares	57
3.23 Ensayos de “sangre total (whole-blood)”	58
3.24 Análisis estadístico	58
RESULTADOS	59
4. Resultados	61
4.1 Expresión de CD36 en el cáncer de pulmón.....	61
4.1.1 Meta-análisis de bases de datos	61
4.1.2 Análisis histológico de CD36 en pacientes	62
4.2 Características troncales de las células madre aisladas de líneas tumorales	65
4.3 Determinación de la fusión celular in vitro	69
4.4 Caracterización de los híbridos	72
4.4.1 Entidad de los híbridos	72
4.4.2 Funcionalidad	78
4.5 Papel de CD36 en la formación de los híbridos.....	83
4.5.1 Sobreexpresión de CD36	83
4.5.2 Inhibición de la expresión de CD36	85
4.5.3 Mecanismos moleculares reguladores de la fusión	85

4.6 Marcadores distintivos de la fusión en pacientes de cáncer de pulmón.....	87
DISCUSIÓN.....	99
5. Discusión	101
5.1 Propiedades de los tipos celulares presentes en el nicho tumoral.....	101
5.1.1 CD36 como marcador de mal pronóstico en cáncer.....	101
5.1.2 Células tumorales y células madre tumorales.	102
5.2 La fusión celular.	102
5.2.1 Evidencia experimental.	102
5.2.2 Propiedades de los híbridos generados en la fusión celular.....	103
5.3 Mecanismo de la fusión.	105
5.3.1 Importancia de la expresión de CD36.	105
5.3.2 Papel del estado fisiológico de los Mos.	106
5.4 Marcadores de células fusionadas encontradas en pacientes y relacionadas con la progresión metastática.	108
CONCLUSIONES	109
7. Conclusiones.....	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
7. Referencias bibliográficas	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema Internacional de Estadificación del cáncer de pulmón, según la clasificación TNM.....	27
Tabla 2. Cebadores utilizados para qPCR.....	51
Tabla 3. Anticuerpos de citometría usados en este trabajo	52
Tabla 4. Anticuerpos usados para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en este trabajo	54
Tabla 5. Clasificación de las muestras de pulmón según la expresión de CD36 por inmunohistoquímica.	63
Tabla 6. Valoración de pulmón y ganglios.....	83
Tabla 7. Clasificación de las muestras de pulmón según la co-localización de Pank/CD36/CD14 por inmunohistoquímica.	88
Tabla 8. Valoración de muestras humanas pareadas de pulmón y sus metástasis.	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón ⁵	24
Figura 2. Clasificación por grados del cáncer de pulmón (modificado de Detterbeck FC et al. ¹⁸).	28
Figura 3. Marcas distintivas del cáncer (modificado de Hanahan et al ⁴²).....	30
Figura 4. Meta-análisis de la expresión de CD36 en pacientes con cáncer de pulmón.	61
Figura 5. Estudio en pacientes del marcador CD36.	64
Figura 6. Evolución del cultivo celular en función del método selectivo.....	66
Figura 7. Diferencias en la expresión de marcadores entre H460 y H460-CSCs después de 7 días de cultivo.	68
Figura 8 Fusión celular con la línea H460.....	70
Figura 9. Fusión celular con la línea A549.	71
Figura 10. Fusión entre diferentes tipos celulares.	72
Figura 11. Adherencia de las células híbridas.	73
Figura 12. Cariotipado de las diferentes poblaciones separadas por citometría.	74
Figura 13. Secuenciación masiva de RNA.....	75
Figura 14. Validación de los datos obtenidos en la secuenciación masiva de RNAm.....	77
Figura 15. Marcadores de las diferentes poblaciones aisladas por citometría de separación ...	78
Figura 16. Invasión de las diferentes poblaciones celulares	79
Figura 17. Capacidad formadora de tumores y expansión.	80
Figura 18. Inmunogenicidad de las diferentes poblaciones.....	81
Figura 19. Capacidad invasiva in vivo de los híbridos.	82
Figura 20. Sobreexpresión de CD36 en monocitos y H460-CSC.....	84
Figura 21. Inhibición de CD36 en monocitos y H460-CSC.	85
Figura 22. Implicación de la polarización de los Mos en la fusión con H460-CSC.....	87
Figura 23. Marcadores específicos para el cáncer de pulmón y que definen el estadio de la metástasis.	89
Figura 24. Marcadores específicos que definen el estadio de la metástasis en células circulantes.	90
Figura 25. Imágenes de tejido tumoral y sus metástasis correspondientes.	97
Figura 26. Esquema del proceso de fusión celular.....	107

ABREVIATURAS

(Para conseguir más fluidez en el manuscrito, hemos optado por mantener las abreviaturas inglesas de la mayoría de los factores, moléculas, etcétera, que hacemos referencia)

BSA: Bovine serum albumin

cDNA: complementary DNA

CSCs: Cancer Stem Cells

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition

FBS: Fetal bovine serum

FGF: Fibroblast growth factors

GFP: Green Fluorescent Protein

L Φ : Linfocito

Mos: Monocitos/Macrófagos

NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer

N Φ : Neutrofilo

NKs: Natural killer cells

NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffered Saline

PEG: Polyethylene glycol

PFA: Paraformaldehyde

qPCR: Quantitative PCR

PanK: Pan-citoqueratinas

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

SCLC: Small Cell Lung Cancer

TAM: Tumour Associated Macrophages

ULA: Ultra Low Attachment

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer

1.1.1 Generalidades

Bajo el término **cáncer** se agrupan numerosas enfermedades cuya característica en común es la aparición de células con división anormal e incontrolada (**neoplasia**) y que, salvo excepciones, son capaces de transmitir esta propiedad a los tejidos adyacentes¹. Existen diversos factores (véase 1.1.2) que hacen que el cáncer se desencadene a partir de la progresiva acumulación de mutaciones en las células, llevando a la formación de masas celulares (**tumor primario**) en un órgano de origen y la diseminación de las células malignas en localizaciones distales en el proceso de metástasis (**tumores secundarios**), con el consecuente fallo progresivo de los diferentes órganos afectados conllevando finalmente a la muerte del individuo.

Sin embargo, no todas las neoplasias tienen la misma progresión; las neoplasias benignas, como su nombre indica, detienen su crecimiento. Por su parte, las neoplasias malignas presentan un crecimiento expansivo e invasivo a otros órganos próximos o alejados del tumor primario, en el proceso de **metástasis** (véase 1.2.3).

1.1.2 Epidemiología

Según el último informe de la OMS, ²en 2012 fueron diagnosticados 14 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, con expectativas de un aumento del 70% en las próximas dos décadas; siendo así, la segunda causa de muerte, con 8.8 millones al año, sólo por detrás de los accidentes cerebrovasculares.

Esta incidencia está determinada tanto por factores intrínsecos como extrínsecos ^{3, 4}. Entre los primeros sobresalen la predisposición genética, la tasa metabólica y las características del sistema inmune del individuo. Los agentes extrínsecos, a su vez, se dividen en tres categorías, y su influencia varía según la región del mundo que se analice:

- Carcinógenos físicos, tales como el radón o la radiación ultravioleta, relacionados con tumores melánicos.
- Carcinógenos químicos, tales como componentes del tabaco o determinados fármacos relacionados con neoplasias pulmonares y de vejiga.

- Carcinógenos biológicos, responsables del 15% de los casos de cáncer y entre los que destacan: *Helicobacter pylori* (92% de todos estos casos) y los virus del papiloma humano, y virus de las hepatitis B y C, relacionados con cáncer gástrico, uterino, de esófago y hepático.

Existen además diferentes factores de riesgo que incrementan la probabilidad de aparición del proceso neoplásico y cuyo control podría reducir hasta en un 30% la probabilidad del desarrollo carcinogénico, según datos de la OMS. Entre los más importantes se encuentran la adicción al alcohol y al tabaco, los malos hábitos alimentarios, la obesidad y las infecciones víricas.

1.1.3 Cáncer de pulmón

1.1.3.1 Definición y epidemiología

El cáncer de pulmón es el más diagnosticado y con mayor tasa de mortalidad ² (Fig. 1). Se estima que la tasa de supervivencia a 5 años o más es del 10%, lo que supone un elevado gasto sanitario y su consecuente impacto social y económico.

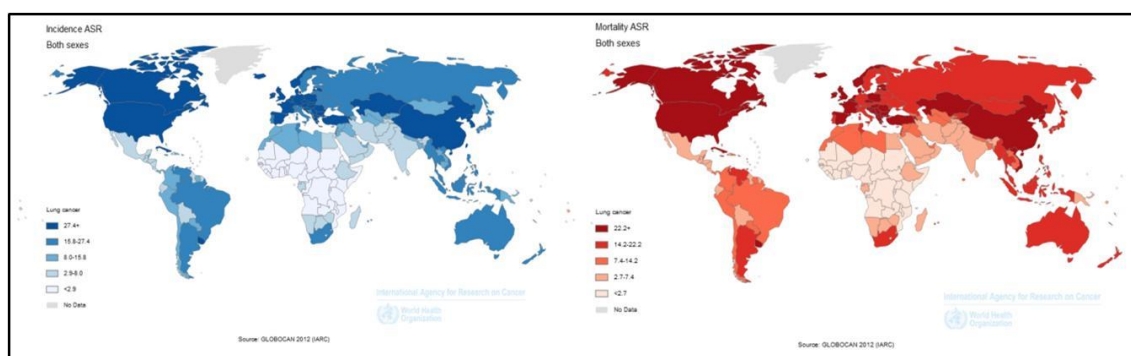


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón ⁵.

El término **carcinoma broncogénico** engloba a todo tumor maligno de estirpe epitelial originado en el epitelio de revestimiento o glandular del árbol bronquial. Debido a que constituye el tipo tumoral más frecuente de las neoplasias pulmonares primitivas (más del 90%) también se le denomina, de forma genérica, “cáncer de pulmón”. Según las estadísticas del 2015, éste produce un total de 1.69 millones de muertes al año ⁶ siendo el segundo en incidencia ^{7, 8} entre hombres, con el 85-90% de los casos debido al consumo de tabaco y los componentes carcinógenos, co-carcinógenos y promotores tumorales que contiene ⁹. El incremento de esta adicción

entre las mujeres, en las últimas décadas, ha originado que se esté observando también un aumento en su prevalencia.

Históricamente, la primera mención a que la inhalación del humo del tabaco fuera una causa del cáncer de pulmón fue hecha por Adler en 1912 ¹⁰. El primer estudio científico que avaló la asociación de muerte prematura con este carcinógeno apareció en 1938 ¹¹. Sin embargo, fue en 1950 cuando Doll y Hill demostraron definitivamente la asociación epidemiológica entre el humo del tabaco y la mortalidad del cáncer de pulmón ¹².

Los eventos que conducen a la transformación maligna de las células broncoepiteliales son desconocidos. Los datos epidemiológicos indican que la exposición ambiental a carcinógenos extrínsecos induce o facilita la transformación, pero esto viene modulado por las variaciones genéticas que en muchos casos afectan a aspectos del metabolismo de los carcinógenos, como la conversión de pro-carcinógenos a carcinógenos y su inactivación. Este proceso necesita de un elevado número de transformaciones genéticas y epigenéticas ¹³, mayoritariamente en genes supresores de tumores y proto-oncogenes.

1.1.3.2 Clasificación

Tradicionalmente, el carcinoma broncogénico se había clasificado siguiendo criterios histológicos y clínicos por separado, dando lugar a nomenclaturas distintas. Posteriormente se hizo unificando criterios histológicos y clínicos en “cáncer de pulmón de célula pequeña” (*small-cell lung cancer, SCLC*) y “cáncer de pulmón de célula grande” (*non-SCLC, NSCLC*), quedando esta clasificación actualmente obsoleta.

La OMS en su clasificación de 2015 ¹⁴, que aplicaremos en esta tesis, hace mayor énfasis en las técnicas inmuno-histoquímicas y genéticas para la diferenciación de los diferentes tipos de carcinoma:

- **Adenocarcinoma:** Es de tipo epitelial con diferenciación glandular, expresión de TTF-1 y/o de Napsina-A, diseminación ganglionar temprana y rápida metastatización. Histológicamente se puede considerar dentro de este grupo al carcinoma bronquioalveolar, aunque clínico-patológicamente es distinto.

- Carcinoma de célula escamosa: Es de los más relacionados con el tabaco, diseminándose generalmente a ganglios linfáticos fuera de la cavidad torácica, positivos para los marcadores escamosos P40 y P63.
- **Tumores neuroendocrinos**: Tumores derivados de las células neuroendocrinas del epitelio bronquial, positivas para CD56.
 - Carcinoma de célula pequeña: Se caracteriza por ser bastante agresivo, con un tiempo de duplicación bastante corto, gran capacidad de metastatizar y por los marcadores cromogranina y sinaptofisina¹⁵. Este carcinoma sería del tipo SCLC.
 - Carcinoma de célula grande: Sólo puede diagnosticarse tras resección quirúrgica del tumor. En muchos casos su clasificación se hace por un criterio de exclusión sobre los demás tipos de carcinomas, ya que son negativos para TTF-1 o P40. Casi todos se producen en fumadores, metastatizando por lo general a ganglios hiliares o mediastínicos. Este carcinoma sería del tipo NSCLC.
 - Carcinoma adenoescamoso: Está compuesto en volumen por al menos un 10% de carcinoma de célula escamosa y de adenocarcinoma.
 - Papiloma de célula escamosa: Papiloma proveniente del epitelio escamoso.
 - Adenocarcinoma papilar: Neoplasia poco común localizada generalmente en la periferia del pulmón. Positivo para Ki-67, TTF-1 y CK7¹⁶ y con potencial de malignidad mediano.

La clasificación TNM (Tabla 1) responde a preguntas clínicas una vez diagnosticado el cáncer de pulmón: tamaño e invasión del tumor a los tejidos adyacentes (T), diseminación linfática nodo-regional (N) y diseminación metastática a otras regiones del organismo (M).

Además, según el grado de diferenciación (Fig. 2) pueden clasificarse en¹⁷:

- **Grado I**: Las células tumorales se limitan al pulmón, sin invasión de tejidos adyacentes.
- **Grado II**: La neoplasia se disemina a ganglios linfáticos adyacentes e incluso a la pleura.

- **Grado III:** Los ganglios linfáticos del pulmón contrario y del cuello se encuentran afectados, con posibilidad de encontrarse afectado el diafragma, pleura mediastínica o el pericardio.
- **Grado IV:** La neoplasia se encuentra diseminada por otras partes del organismo.

T (Tumor Primario)		Abreviatura
T0	Sin tumor primario	
Tis	Carcinoma "in situ" (Escamoso o Adenocarcinoma)	Tis
T1	Tumor ≤ 3cm	
T1 a	(mi) Adenocarcinoma mínimamente invasivo	T1a(mi)
T1a	Invasión superficial del tumor en vías aéreas centrales	T1aSS
T1a	Tumor ≤1 cm	T1a≤1
T1b	Tumor >1 pero ≤2 cm	T1a≤1-2
T1c	Tumor >2 pero ≤3 cm	T1a≤2-3
T2	Tumor >3 pero ≤5 cm o tumor en:	
	Pleura visceral	T2 Visc PI
	Bronquios principales, atelectasia	T2 Centr
T2a	Tumor >3 pero ≤4 cm	T2a>3-4
T2b	Tumor >4 pero ≤5 cm	T2b>4-5
T3	Tumor >5 pero ≤7 cm o:	T3>5-7
	Invadiendo la pared pectoral, pericardio y nervio frénico	T3 Inv
	Nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo	T3 Satell
T4	Tumor >7 cm o:	T4>7
	Tumor invadiendo: mediastino, diafragma, corazón, grandes vasos, nervio laríngeo, tráquea, esófago.	T4 Inv
	Nódulos tumorales en diferentes lóbulos ipsilaterales	T4 Ipsi Nod
N (Nódulos Linfáticos Regionales)		
N0	Sin metástasis en nódulos linfáticos regionales	
N1	Metástasis pulmonar en nódulos ipsilaterales o hiliares	
N2	Metástasis en nódulos ipsilaterales mediastinales/subcarinales	
N3	Metástasis en nódulos contralaterales mediastinales/hiliares o en supraclaviculares	
M (metástasis distales)		
M0	Sin metástasis distal	M1a PI Disem
		M1a Contr
M1a	Infiltrado maligno pleural/pericárdico o en sus nódulos	Nod
M1b	Metástasis extratorácica simple	M1b Single
M1c	Metástasis extratorácica múltiple >1 órgano	M1c Multi

Tabla 1. Sistema Internacional de Estadificación del cáncer de pulmón, según la clasificación TNM.

Los pacientes con grado I y II son candidatos para cirugía, con buen pronóstico. A los de grado III se les suele tratar con radioterapia y quimioterapia. También a los de grado IV, aunque con una finalidad paliativa y de aumentar en lo posible la supervivencia del paciente.

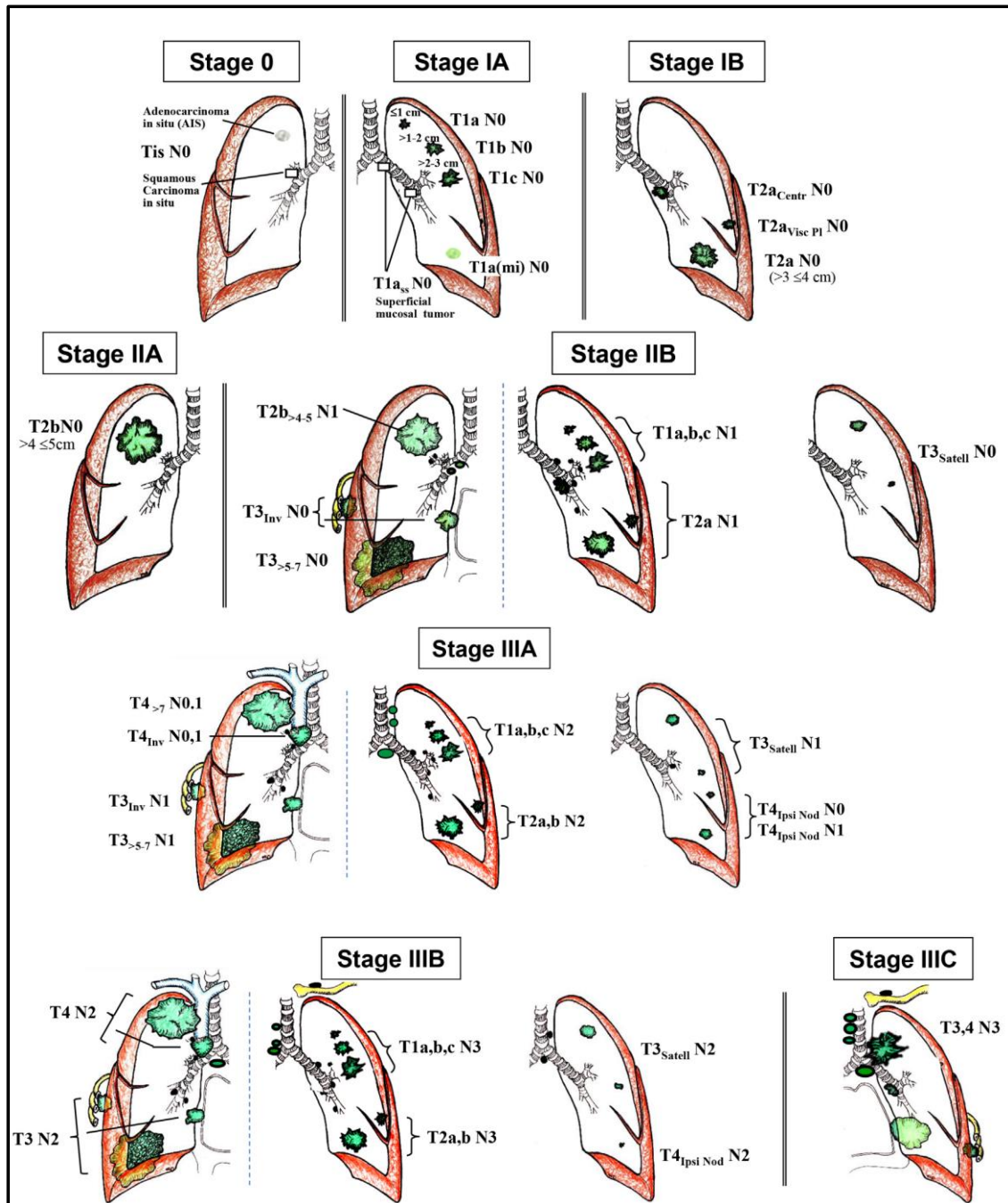


Figura 2. Clasificación por grados del cáncer de pulmón (modificado de Detterbeck FC *et al.* ¹⁸).

1.1.3.3 Líneas celulares de cáncer de pulmón

Aproximadamente el 85% de los casos de cáncer de pulmón son diagnosticados como NSCLC. A pesar de los progresos en el tratamiento clínico de la enfermedad, la tasa de supervivencia de estos pacientes no ha mejorado en concordancia ¹⁹, siendo de un año en un 44% y de 5 años un 17%. En esta tesis se han utilizado dos modelos *in vitro* de cultivo, con las líneas celulares establecidas para NSCLC: **H460** y **A549**.

La línea H460 proviene del líquido pleural de un paciente con carcinoma de célula grande hipotriploide con expresión de altos niveles de P53 detectables por mRNA. Fue establecida en 1982 por el doctor Ardi F. Gazdar ²⁰. Por su parte, la línea A549 establecida por D.J. Giard en 1972 ²¹, proviene de un carcinoma pulmonar hipotriploide con poliploidía en los cromosomas X e Y procedente de un paciente de 58 años.

1.2 Bases fisiológicas de la patología

1.2.1 Células troncales del cáncer

En el cáncer están descritos dos modelos con los cuales podríamos definir algunas de las propiedades de las células tumorales. El primero es el **modelo estocástico**, el cual sugiere que todas las células de un tumor son potencialmente iniciadoras de tumores, normalmente debido a dos mutaciones en genes específicos ²²⁻²⁴. Según este modelo sería imposible detectar cuáles células podrían iniciar un tumor. El segundo es el **modelo jerárquico** de progresión de un tumor, en el cual se propone que solo un pequeño porcentaje de las células de un tumor pueden llegar a iniciar un cáncer (células troncales del cáncer; *cáncer stem cells*, **CSCs**) ^{25, 26}. Según ésta, es posible poder detectarlas ya que fenotípica y funcionalmente son diferentes.

Las CSC tienen como propiedades principales la pluripotencia y la capacidad de generar, durante su división, dos tipos de células hijas: una con diferenciación programada dependiente de tejido y otra que mantiene las propiedades de célula pluripotente, renovando así el nicho de CSCs ²⁶. Además, son resistentes a la anoikis ^{27, 28}, a quimioterapias ^{29, 30} y tienen una elevada capacidad tumorigénica ³¹. Se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos tales como: SOX9 ³², VEGF ³³, CD133 ³¹, Vimentina³⁴, Nanog³⁵, Oct3/4 ^{36, 37}, cMyc³⁸, Sox2 ³⁹, Klf4 ⁴⁰.

1.2.2 Marcas distintivas

Hanahan y Weinberg en 2000⁴¹ postularon las marcas distintivas (*hallmarks*) del cáncer, en lo que constituye un principio organizado de racionalización, ante la complejidad de la enfermedad neoplásica y su desarrollo. Más tarde, los mismos autores redefinían estas marcas que agrupan las numerosas vías intracelulares necesarias para el desarrollo del cáncer en el órgano de origen (Fig. 3). Inicialmente fueron establecidas como una ayuda para el entendimiento y la descripción de una enfermedad tan compleja y de origen tan variado, pero se han convertido en una poderosa herramienta para la sistematización del abordaje de la investigación oncológica.

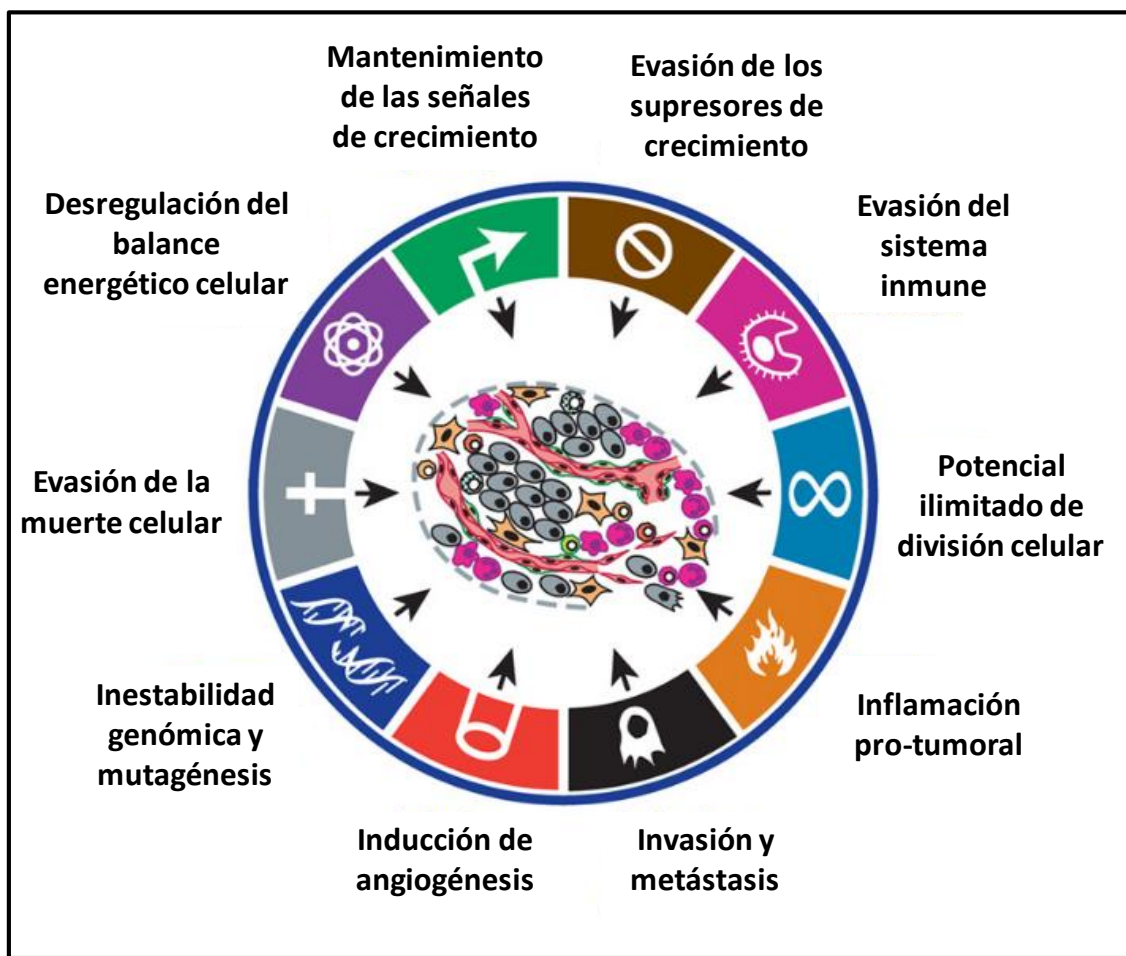


Figura 3. Marcas distintivas del cáncer (modificado de Hanahan *et al*⁴²)

En este primer estudio fueron postuladas seis marcas distintivas del cáncer:

- Evasión de la muerte celular mediada por apoptosis. Por ejemplo, a través de la familia de proteínas BCL-2, BH-3 o pérdida de TP53^{43, 44}, mediante la autofagia

que media entre la supervivencia y muerte de la célula tumoral ^{45, 46} o la necrosis, por su potencial pro-tumoral y efecto proinflamatorio⁴⁷.

- Mantenimiento de las señales de proliferación⁴⁸⁻⁵². Por ejemplo, mediante activación de cascadas de señalización por mutaciones somáticas en c-KIT o BRAF en melanoma ⁵³ o por la conjunta sobre activación de PI3K y pérdida de PTEN en tumores sólidos ⁵⁴⁻⁵⁶. También, debido a la disrupción de los mecanismos de retroalimentación negativa que atenúan la proliferación, así como a través de la ubiquitinización⁵⁷ o por fallos en la endocitosis ⁵⁸.
- Evasión de supresores del crecimiento. Por ejemplo, a través de la vía de señalización de la proteína del riboblastoma⁵⁹ o de las ciclinas ⁶⁰, por mecanismos de evasión de la inhibición por contacto a través de la señalización por EGFR-NF2 y su producto Merlin⁶¹, por la inhibición de la proteína de polaridad epitelial LKB1 con el consecuente aumento de c-Myc en el síndrome de poliposis y cáncer de Peutz-Jeghers^{62, 63} o por problemas en la vía de TGFβ⁶⁴⁻⁶⁶.
- Inducción de angiogénesis. Por ejemplo, a través de factores como VEGF ^{67, 68} se han encontrado diferentes niveles de angiogénesis dependiendo del tumor ^{69, 70}. También, debido a la desregulación de los reguladores naturales de este proceso⁷¹.
- Potencial ilimitado de división celular. Por ejemplo, mediante la protección del tamaño de los telómeros ⁷², con evidencias de que en algunos casos este acortamiento telomérico parece ayudar en los estadios tempranos de la tumorigénesis por su relación con la formación de cromosomas fusionados, o por la desregulación de P53 ^{73, 74}.
- Invasión y metástasis. Por ejemplo, por la expresión de cadherinas y otras proteínas relacionadas con migración ⁷⁵⁻⁷⁷ u otras que interaccionan con la matriz extracelular del microambiente tumoral ⁷⁶.

Aunque estas seis marcas agrupaban los principales procesos y características del desarrollo de la neoplasia, en 2011 Hanahan y Weinberg ⁴² definieron otras tres adicionales:

- Inestabilidad genómica y mutagénesis, gracias a la cual las células tumorales obtienen las diferentes alteraciones ⁷⁸ encontrándose en las mismas un ratio más

elevado de mutagénesis ⁷⁹ posiblemente ocasionado por mutaciones en genes que actúan de manera similar a oncosupresores en la protección del DNA ⁸⁰.

- Desregulación del balance energético celular, observado por primera vez por Otto Warburg⁸¹, en cuyo estudio describe la posibilidad de que las células tumorales sean capaces de reprogramar su metabolismo de glucosa, incluso en presencia de oxígeno, limitando su producción de energía a la glicolisis, en un proceso que denominó glicolisis aeróbica. Este cambio está sustentado por la sobreexpresión de GLUT1 en las células malignas con el consecuente aumento de la entrada de glucosa, proceso asociado con la activación de oncogenes y la inhibición de supresores tumorales ^{82, 83}.
- Inflamación pro-tumoral⁸⁴, la cual ayuda de manera determinante a la progresión tumoral ⁸⁵⁻⁸⁷ y en la que profundizaremos más adelante (véase 1.3.2).
- Evasión del sistema inmune, evidente cuando se analiza la alta incidencia de casos de cáncer en individuos inmunodeprimidos ⁸⁸, al contrario que en modelos con ratones deficientes en NKs y linfocitos T, ya que a pesar de que tienen mayores tumores, por ellos solos no forman tumores secundarios ⁸⁹. Ahondaremos en ello en siguientes apartados (véase 1.3.2).

En todas estas marcas encontramos una base lógica y sistemática del origen y desarrollo del cáncer, excepto en las relacionadas con el sistema inmune, que aparte de haber sido postuladas como marcas muy recientemente, nuevos estudios indagan sobre su importancia y aparente necesidad para la metástasis⁹⁰. De manera general, el concepto de metástasis queda implícito en la mayoría de ellas; es decir, en el proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano diferente, influirán muchas, si no todas, las marcas distintivas.

1.2.3 Metástasis

Debido a su relevancia clínica en el pronóstico de los pacientes, la metástasis es el aspecto más crítico de la tumorogénesis, siendo el causante del 90% de las muertes en enfermos de cáncer ⁸⁶. La primera descripción de la metástasis fue dada por J. C. A. Récamier (1774-1852) ⁹¹, definiéndola como una enfermedad de diferentes estadios consecutivos que concluía con la invasión por parte del tumor de órganos distantes. Hoy en día se mantiene como la propuesta más aceptada para este proceso la postulada por Paget en 1889 de “**semilla y tierra**” (*seed and soil*) ⁹². En ella la metástasis a órganos

distales estaría basada en una interacción entre la célula tumoral “semilla” y el lugar de metástasis “tierra” donde se asienta. En esta hipótesis encontramos tres principios fundamentales: Primero, que las neoplasias primarias y las metástasis no están formadas solamente por células tumorales, sino que también hay que incluir el **microambiente tumoral** y las diferentes células que se encuentran en él, tales como los fibroblastos y el infiltrado inmune. Segundo, que para el abordaje de la metástasis es necesario un estudio del proceso de selección del pequeño porcentaje de células que consigue completar el proceso y metastatizar al órgano diana. Y tercero, que los órganos diana en los que se produce la metástasis son únicos y no aleatorios.

Durante el proceso de tumorigénesis hay una gran variedad de células del microambiente tumoral que ayudan e intervienen en su progresión ⁹³ y que concluye en una **transición epitelio-mesenquimal (TEM)**. La TEM consiste en un cambio al fenotipo mesenquimal, derivado de las diferentes marcas distintivas del cáncer, que permite a la célula tumoral migrar hacia órganos distantes y concluir con el desarrollo de tumores secundarios en otros órganos. Este proceso sólo es llevado a cabo por un pequeño número de células del tumor primario ^{94, 95}, por lo que debe ser un evento difícil, poco probable y por ende, difícil de abordar. Este concepto de **metástasis dirigida** a un órgano en específico se ha visto avalado en los últimos tiempos por evidencias sobre la acción de los exosomas en la preparación del microambiente tumoral ⁹⁶.

1.3 El sistema inmunológico

En individuos sanos, el sistema inmunológico constituye la primera barrera de defensa del organismo frente a las agresiones del medio ambiente, ya sean estímulos externos (agentes patógenos, radiaciones, contaminaciones) o internos (células tumorales). Se subdivide en: sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo.

El **sistema inmune innato** se encuentra presente en casi todos los organismos vivos y es el encargado del reconocimiento de los patrones ajenos y agresivos a la homeostasis del individuo. Además, se encarga de la activación del sistema inmune adaptativo en la “presentación de antígeno”. Por su parte, el **sistema inmune adaptativo** sólo se encuentra en vertebrados. Aunque participa también en el reconocimiento de elementos extraños, su principal función es crear una memoria inmunitaria de aquellos y tolerante hacia los antígenos propios.

Los componentes celulares del sistema inmune tienen su origen en la médula ósea e incluyen a las células mieloides (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas) y a las células linfoides (linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales o natural killers, NK).

1.3.1 Monocitos

Los monocitos son una estirpe celular proveniente de los progenitores mieloides de la médula ósea, que representa alrededor de un 10% del total de leucocitos en humanos ⁹⁷. Son las principales células del sistema inmune innato, participando en procesos de mantenimiento de la homeostasis y protegiendo al individuo frente a infecciones ⁹⁸. Una gran parte de ellos se localiza en médula y bazo, disponibles para ser movilizados en el momento que sea necesario a los lugares de inflamación ⁹⁹ siguiendo los gradientes de quimiocinas ¹⁰⁰. El resto se encuentra circulando en la sangre, donde mueren al cabo de 48 horas de no ser reclutados hacia los órganos. Sin embargo, al infiltrarse en los distintos tejidos, comienzan su diferenciación a **macrófagos Mos**, proceso durante el cual sus perfiles transcripcionales cambian drásticamente originando clases únicas en dependencia del tejido de residencia: osteoclastos (huesos), células microgliales (SNC), histiocitos (tejido conectivo), células de Kupffer (hígado), células de Langerhans (piel) y Mos alveolares (pulmón).

La polarización es el proceso mediante el cual los Mos son activados a diferentes fenotipos. El **fenotipo M1** o clásico, responde a una activación mediada por interferon- γ ¹⁰¹ y les confiere una respuesta básica de macrófagos: eliminación de patógenos, presentación de antígeno y actividad tumoricida. Por su parte, el **fenotipo M2** o alternativo que ha sido ampliamente escrito en nuestro laboratorio ^{102, 103}, aparece en procesos o estados refractarios en varios contextos clínicos que va desde la sepsis hasta los procesos tumorales¹⁰⁴. Ambos fenotipos son distinguibles por la ausencia de respuesta pro-inflamatoria frente a un estímulo y la expresión de algunos marcadores tales como: el receptor del complejo hemoglobina/haptoglobina, **CD163** ¹⁰⁵ y las moléculas implicadas en señalización **IRAK-3** o **M** ^{106, 107} y **HIF1 α** ¹⁰⁸. También es característico de un estado M2 una baja expresión de **HLA-DR** ¹⁰⁹.

Se han publicado diversos estudios sobre los mecanismos moleculares por los cuales el microambiente tumoral es capaz de modular la polarización de los Mos asociados a tumores (*tumour associated macrophages*, **TAM**) ¹¹⁰. En contraste con los

monocitos/macrófagos, que generan una respuesta citotóxica contra células malignas¹¹¹, los TAM presentan una reprogramación en su actividad inmunológica que les hace perder la eficiencia contra los tumores. Al ser reclutados a través de quimocinas y factores de crecimiento secretados por el tumor, como TGFβ, CCL2 o MCSF-1¹¹² su fenotipo es similar al M2, caracterizado por alta expresión de IL-10, TGFβ, VEGF, quimocinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y la baja expresión de IL12p40; además, cooperan en la progresión tumoral, al secretar factores que inducen la proliferación e invasión, propiciando la angiogénesis y la metástasis neoplásica¹¹³. Las características del fenotipo M2, así como de los TAM son motivo de estudio, ya que pueden presentar perfiles variables dependiendo de la situación, tipo de cáncer y microambiente. Por otra parte, es patente que los Mos que inicialmente son efectivos contra tumores, cuando entran en contacto con el microambiente tumoral modifican progresivamente su perfil volviéndose incapaces de generar una respuesta antitumoral clásica¹¹⁴.

1.3.2 Linfocitos

Los linfocitos son leucocitos provenientes de la diferenciación de las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea. Representan alrededor de un 30% del total de las células de la sangre periférica y su función principal es la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Se clasifican en tres líneas celulares reactivas: **linfocitos B**, que maduran en la médula ósea y migran a los tejidos diana, encargándose de la respuesta inmune humoral; **linfocitos T**, que se desarrollan en el timo y forman parte de la respuesta inmunitaria celular; y las células asesinas naturales (*natural killer cells*, **NKs**), encargadas de la destrucción de las células infectadas o alteradas.

1.3.2.1 Linfocitos B y T

Los linfocitos B y T son células con funciones muy diferentes a pesar de su origen común. Desde la década de 1960 se sabe que ambos son responsables de la producción de anticuerpos y de la respuesta inmune mediada por células^{115, 116} gracias a modelos *in vitro* e *in vivo*, así como ensayos con muestras de pacientes.

Los linfocitos B, al ser activados por un antígeno, forman un clon de células que producen y segregan anticuerpos específicos para el mismo. Se distinguen por la presencia del complejo BCR en su superficie, que consta de dos cadenas pesadas y dos

ligeras, varían según el antígeno o la inmunoglobulina detectada y pueden ser liberados al medio en forma de inmunoglobulinas¹¹⁷.

Los linfocitos T pueden clasificarse en dos poblaciones principales: “*helper*” y citotóxicos. Los linfocitos T “*helper*”, que expresan el receptor CD4 y cuya función es colaborar con otros linfocitos al ocurrir el reconocimiento antigénico, una vez activados se subdividen en linfocitos T “*helper*”-1 activos (que favorecen la inmunidad celular produciendo citoquinas IFN- γ , TNF- β e IL-2) y T “*helper*”-2 activos (que favorecen la inmunidad humoral produciendo citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Por otro lado, los linfocitos T citotóxicos expresan el receptor CD8 y destruyen células con antígenos extraños o alterados¹¹⁸.

1.3.2.2 NKs

Desde la década de 1990, el conocimiento de la biología y función de las NKs, ha llevado a entender la importancia de estas células en la respuesta antitumoral.

Las NKs se desarrollan en la médula ósea a partir de las células progenitoras linfoides comunes¹¹⁹ pero sus precursores no están aún bien caracterizados en humanos^{120, 121}. Su maduración se realiza principalmente en la médula, aunque también en nichos extra-medulares (hígado, nodos linfáticos y timo)^{122, 123}, dirigida por los factores de transcripción Eomesodermina (EOMES) y T.box (T-bet)¹²⁴, con supresión de RORC¹²¹. Luego de su desarrollo, se distribuyen ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides, incluyendo la médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, sangre periférica, pulmón y el hígado¹²⁵. Se caracterizan como linfocitos CD3⁻CD56⁺, separándose en los subconjuntos CD56^{bright} y CD56^{dim}. Aproximadamente el 90% de las NKs de sangre periférica pertenecen al subconjunto CD56^{dim}CD16⁺, con una marcada función citotóxica¹¹⁸⁻¹¹⁹. A su vez, la mayoría de las células NK en los ganglios linfáticos y amígdalas pertenecen al subconjunto CD56^{bright}CD16⁻, con un papel regulador del sistema inmune y producción de IFN- γ , IL-12, IL-15 e IL-18^{126, 127}.

Una vez maduras, las NKs son capaces de eliminar rápidamente células diana sin inmunización previa gracias a la limitación del MHC-I, de aquí su implicación en la respuesta inmune innata y antitumoral. Por ello, la activación de las NKs es dependiente del equilibrio entre señales de inhibidores y activadores de sus correspondientes receptores. En el estado estacionario, los receptores inhibitorios (KIR y

CD94/NKG2A/B) se unen a diversas moléculas del MHC-I que presentan todos los tipos celulares, inhibiendo la activación de las NKs y previniendo su acción ¹²⁸.

1.3.3 Sistema inmune y cáncer

El sistema inmune es el principal involucrado en la prevención y erradicación de tumores. Ya en 1909, Paul Ehrlich postulaba que el cáncer sería más frecuente si el sistema inmune no controlara la constante aparición de células neoplásicas ¹²⁹. En 1957 Burnet, revisando este estudio, definió el término **inmunovigilancia** (*surveillance*) como la habilidad del sistema inmune para detectar y destruir a las células tumorales previo reconocimiento de antígenos específicos de las células neoplásicas ^{39, 130}. Gracias a estos estudios se comenzó a analizar las poblaciones celulares infiltradas en los tumores para así poder entender mejor la homeostasis del cáncer ¹³¹, la generación de la inmunidad endógena frente a antígenos tumorales ¹³² y la relación entre inmunodeficiencia y cáncer ^{88, 112}. En modelos de generación de tumores espontáneos en ratones, se ha demostrado que el sistema inmune ataca a las células tumorales y controla su expansión ^{133, 134}.

La **inmunoedición** es un proceso dinámico que involucra tanto la inmunosupervivencia como la progresión tumoral ¹³⁵. Las tres principales fases de las que consta son: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de **eliminación**, las células tumorales son reconocidas y destruidas debido al infiltrado del sistema inmune, quedando ocasionalmente una población de células menos inmunogénicas e invisibles a él ¹³⁶. En la fase de **equilibrio**, el crecimiento del tumor y su eliminación por parte del sistema inmune son similares, aumentando, en algunos casos, la vida del individuo ⁸⁹. La última fase, el **escape**, es consecuencia de la reducción de la inmunogenicidad, debido ocasionalmente a la selección de una población tumoral menos inmunogénica y a la adquisición de mecanismos inmunosupresores ¹³⁷.

Se han encontrado indicios de que las células tumorales pueden presentar deficiencias en la vía de procesamiento y presentación de antígenos, pudiendo ser ésta una de las maneras por la cual el tumor evade la respuesta adaptativa ¹³³, aunque también pueden suprimir la inducción de señales inflamatorias, con el consecuente fallo en la maduración de células dendríticas ¹³⁸, imposibilitando la activación de la respuesta adaptativa ¹³⁹.

Existen multitud de evidencias que demuestran la plasticidad de las células del sistema inmune en el control y desarrollo del crecimiento tumoral, muchas veces relacionada con la obtención de las marcas distintivas del cáncer. Las células malignas pueden desarrollar mecanismos para evadir la acción de las NKs¹⁴⁰, tales como el establecimiento de un entorno privilegiado rico en citocinas (como el factor de crecimiento tumoral TGF- β) con actividad inmunosupresora capaz de suprimir la respuesta citotóxica de las NKs¹⁴¹. También vemos esta plasticidad en los Mos, que inicialmente están implicados en la destrucción de las células malignas, pero también son los responsables de colaborar en la angiogénesis y la metástasis en los estadios más tardíos¹⁴²⁻¹⁴⁴. Muchos estudios afirman que en el microambiente tumoral se genera un equilibrio entre las células tumorales y Mos, dando lugar a procesos de colaboración y evasión del propio tumor^{111, 145}. Con todo ello, se confirma que el fenotipo y el desarrollo del tumor son un reflejo de las interacciones entre la célula tumoral y el sistema inmune¹¹².

Por todo esto, los mecanismos por los cuales la célula tumoral es capaz de potenciar este escape del sistema inmune y cómo los obtiene, es uno de los desafíos más importantes en la investigación oncológica, para poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas o potenciar las existentes.

1.4 Fusión celular

La fusión celular es el proceso por el cual dos células se fusionan, pudiéndose o no fusionar también los núcleos. Este proceso está presente en el ciclo de los organismos superiores desde su primer estadio de vida: en la formación del huevo o cigoto. Centrándonos en el ser humano, encontramos que durante la vida adulta hay **fusiones homotípicas** (entre células adultas del mismo tipo) como la formación de células gigantes y osteoclastos por los Mos¹⁴⁶, los miocitos para la formación de fibras musculares¹⁴⁷ o en la formación del sincitiotrofoblasto de la placenta¹⁴⁸. Hay ejemplos también de **fusión heterotípica**, como ocurre entre las células dendríticas derivadas de la médula ósea al formar el parénquima. También encontramos procesos de fusión celular bien estudiados en las infecciones virales¹⁴⁹.

La fusión celular presenta tres fases generales: aproximación de las membranas celulares en un **contacto inicial** propiciado por fusógenos, **contacto célula-célula** que conlleva a la hemifusión y formación de un poro entre ellas que termina expandiéndose

hasta **fusionarlas** en una sola célula ¹⁵⁰. Este proceso está regulado por una señalización entre las dos células, en la cual tiene un papel central el citoesqueleto y su reorganización tanto en mioblastos¹⁵¹ como en otros tipos celulares ¹⁵².

Hay distintos métodos descritos por los que se puede inducir la fusión celular en el laboratorio de una manera “no natural”: desestabilización de la membrana por corriente eléctrica, infección con virus Sendai o mediante el empleo de polietilenglicol (PEG).¹⁵³

1.4.1 Fusión celular y cáncer

En 1911, el médico y antropólogo alemán Otto Aichel postuló una teoría con la que intentaba explicar que las variaciones cromosómicas encontradas en el cáncer eran consecuencia de una fusión celular entre un leucocito y una célula tumoral ¹⁵⁴. La misma fue retomada por Meckler^{155, 156} y Goldenberg^{157, 158} medio siglo más tarde. Debido a las imposibilidades técnicas de la época para su comprobación, la teoría fue cayendo en el olvido sin poder ser validada ni refutada. Sin embargo, muchas evidencias apuntan al carácter acertado de esta teoría. Al estudiar el microambiente tumoral se observa que los Mos infiltrados en el tumor ¹⁵⁹ son esenciales para la progresión del cáncer ⁸⁷. Estos Mos ayudan a la degradación de la matriz extracelular, remodelación del tejido y neo-angiogénesis, acumulándose en las regiones más hipóxicas del tumor y sobreviviendo gracias a la utilización de la vía glicolítica de producción de ATP ¹⁶⁰, también llamada **glicolisis aeróbica** o **efecto Warburg** ^{161, 162}. Las células tumorales en estadios avanzados comparten también estas propiedades de degradación de la matriz extracelular, migración, pérdida de adhesión, neo-angiogénesis, efecto Warburg y migración a zonas distantes ⁴².

Recientemente se han encontrado evidencias en pacientes que apoyan esta teoría. Los datos más concluyentes provienen de cuatro casos que recibieron trasplante de médula y aunque padecían diferentes tipos de cáncer, todos desarrollaron tumores en los que se detectaron células con DNA proveniente del donante. Uno de ellos recibió el trasplante de su hermano, desarrollando posteriormente carcinoma renal con metástasis. El grupo sanguíneo del donante era A0 y el del receptor, 00. Al amplificar por PCR el DNA metastático nodal se encontró un alelo A, de manera que se había producido una hibridación del material genético de ambos individuos ¹⁶³. La segunda paciente desarrolló carcinoma papilar renal primario dos años después de recibir el trasplante de

su hijo sano. Al realizar el análisis molecular se encontraron copias de cromosoma Y en las células del carcinoma renal ¹⁶⁴. En ambos casos los donantes permanecieron libres de cáncer durante años, por lo que la hibridación tubo que ocurrir entre las células tumorales y las trasplantadas. Al tercer y cuarto paciente se les realizó un trasplante alogénico para el tratamiento del linfoma de células-B. Más tarde les diagnosticaron un melanoma con metástasis en nodos linfáticos, hígado y cerebro, con foco primario desconocido. Al analizar el DNA genómico de las metástasis cerebrales, mediante la técnica de “polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción”, se demostró la presencia de alelos de los donantes en ambos pacientes. Esto indicaba que la metástasis se había originado por la fusión de células cancerosas y células provenientes de la médula ósea de los donantes ^{165, 166}. Además, en pacientes con mieloma de células-B, se han descrito (mediante FISH) translocaciones cromosómicas provenientes de un clon tumoral en osteoclastos¹⁶⁷.

Diferentes investigaciones en modelos animales también avalan esta teoría. Estudios *in vivo* en intestino de ratones ¹⁶⁸ demuestran que este evento de fusión puede producirse de manera fisiológica y no sólo patológica. Además, han sido descritas células epiteliales fusionadas con Mos en las que se produce una reprogramación genética ^{169, 170}, procesos de fusión en la reparación de células hepáticas ¹⁷¹⁻¹⁷³, e incluso una posible adquisición de otros fenotipos celulares mediante fusión celular de las células provenientes de la médula ósea con la célula diana ¹⁷⁴.

Por ello, la teoría de fusión celular brindaría una explicación de cómo las células tumorales son capaces de obtener parte de las características del sistema inmune, pudiendo evadir los mecanismos inmunes de control y desarrollar la metástasis, al conservar sus propiedades tumorogénicas.

1.4.2. Fusógenos

El concepto de fusión anteriormente explicado carece de sentido sin las bases moleculares para que ello ocurra. En mamíferos los fusógenos más descritos son las sincitinas ^{175, 176}. No obstante, en ratón se han encontrado proteínas relacionadas con la fusión, como CD9 ¹⁷⁷ e IZUMO1 ¹⁷⁸, cuya ausencia impide a los gametos fusionarse para dar lugar al cigoto. Actualmente no se sabe concretamente el mecanismo por el cual éstas actúan y producen la fusión celular, pero se ha demostrado su relación causal.

Por su parte, en macrófagos está bastante descrita la fusión celular en la regeneración del hueso, de los osteoclastos y en situaciones patológicas como la inflamación que dan lugar a células gigantes. La formación de osteoclastos se puede inducir mediante la fusión de Mos usando citocinas como M-CSF, RANKL (vía NF- κ B) o IL-4¹⁷⁹ para la formación de las células gigantes^{180, 181}, proceso en el cual es necesaria la presencia del receptor CD36¹⁸².

1.4.2.1 El receptor de membrana CD36

El receptor (*scavenger*) CD36, también conocido como glicoproteína plaquetaria-4 o translocasa de ácidos grasos, es una proteína integral de membrana expresada en plaquetas, Mos, endotelio vascular y epitelio pigmentario de la retina. Su función más descrita es la introducción de ácidos grasos al interior celular y al desregularse produce patologías relacionadas con diabetes^{183, 184}, obesidad¹⁸⁵ y aterosclerosis¹⁸⁶ debido a la formación de las células espumosas. Se han reportados varios ligandos tales como el colágeno, la trombospodina, eritrocitos parasitados con *Plasmodium falciparum*¹⁸⁷, lípidos de baja densidad oxidados (ox-LDL), lipoproteínas, fosfolípidos oxidados y ácidos grasos de cadena larga.

Esta molécula de membrana está involucrada directamente en la formación de las células gigantes a partir de la fusión entre Mos^{146, 180}. Estas últimas fueron descritas por primera vez en 1868 por Langhans¹⁸⁸ en las lesiones de pacientes con tuberculosis, considerándose que su formación se podría deber a una fusión celular. Más recientemente, se han hallado estas células en diferentes patologías, incluyendo casos en los que se encuentran objetos de gran tamaño en el organismo, tales como prótesis o biomateriales, imposibles de fagocitar por una sola célula¹⁸⁹. El CD36 está involucrado directamente en la fusión celular entre Mo-Mo¹⁸².

En cáncer se ha encontrado este receptor como marcador de metástasis en las células tumorales¹⁹⁰, provocándose una ausencia casi total de metástasis al bloquearlo con anticuerpos α -CD36, aunque su función no está aun completamente establecida.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La teoría de la fusión celular podría dar explicación a muchos aspectos de la metástasis. Un evento de fusión entre células mieloides y neoplásicas que comparten nicho tumoral, genera una nueva entidad celular híbrida capaz de migrar e invadir órganos distantes, iniciando potencialmente la metástasis.

2.2 Objetivos

1.- Determinación de las propiedades de los tipos celulares que componen el nicho tumoral.

1.1- Búsqueda *in silico* del papel de CD36 en la evolución del cáncer de pulmón.

1.2- Análisis histológico de la expresión de estos marcadores en muestras de pacientes de cáncer de pulmón.

1.3- Evaluación de líneas tumorales humanas establecidas como modelos de poblaciones troncales de cáncer de pulmón.

2.-Caracterización de la fusión *in vitro* entre células del sistema inmune y tumorales.

2.1- Determinar la existencia de híbridos de CSC y células del sistema inmune.

2.2- Identificar las células inmunes involucradas en la formación de híbridos.

2.3- Caracterización de las propiedades morfológicas y funcionales adquiridas por los híbridos, relacionadas con las diferentes marcas distintivas del cáncer.

2.4- Elucidar los mecanismos moleculares de la fusión.

3.-Validación *in vivo* de la fusión.

3.1- Determinación de biomarcadores para el reconocimiento de los híbridos.

3.2- Análisis de su presencia en pacientes con cáncer de pulmón, así como su relación con el desarrollo de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron comprados en las siguientes casas comerciales: Miltenyi, R&D, Sigma, BD Biosciences, ThermoScientific, GE Healthcare e Invitrogen. Los medios de cultivo utilizados fueron RPMI 1640 (Invitrogen), DMEM (Invitrogen) y DMEM/F12 (Invitrogen). Cada medio completo se suplementó con 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Todas las soluciones y medios de cultivo estaban libres de LPS, según el test de limulus (LimulusAmebocyteLysate kit de Cambrex).

3.2 Análisis *in silico* de la expresión del gen CD36

Se obtuvieron los datos clínicos de transcripción del gen de CD36 para el adenocarcinoma de pulmón a través del portal *cBioCancerGenomics*^{191, 192}. Se analizaron datos de 513 pacientes diagnosticados como M0, M1, M2 y Mx, dependiendo del estadio de la metástasis. Para el análisis se agruparon como “No metástasis” (M0) y “Metástasis” (M1 y M2), descartándose los Mx.

3.3 Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular H460 comercial (ATCC), así como una variante de la misma transfectada (lentivirus) con el plásmido pGIPZ-shRNAmir-NS (Open Biosystems, ThermoScientific), que expresa GFP constitutivamente. Además, se empleó la línea A549 comercial (ATCC). Ambas líneas son derivadas de cánceres de pulmón y tienen la peculiaridad de poseer subpoblaciones de células madre (CSCs) seleccionables en medio de cultivo específico²⁹. El cultivo celular de la línea H460-GFP fue mantenido en RPMI suplementado al 10% de FBS con puromicina (2.5 µg/mL), mientras que las otras dos líneas se mantuvieron en el mismo medio con suero.

Al alcanzar la confluencia, los cultivos fueron tripsinizados y las células sembradas en placas no tratadas, con medio de selección para CSCs (DMEM/F12), suplementado con Hepes (5mM) (Sigma), fungizona (1x), Gentamicina (0.07%) (Braun), suplemento N-2 (1x) (Thermo Fisher), BSA (0.4%) (Sigma), EGF (20ng/mL) (PEPROTECH) y FGF (10ng/mL) (PEPROTECH). El cultivo se dejó crecer durante 7

días en estas condiciones, refrescándolo cada 2-3 días y expandiéndolo dos o tres veces en el transcurso de ese periodo de tiempo.

3.4 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA

Para cada uno de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS y el RNA total aislado utilizando el kit *High Pure RNA Isolation* (Roche Diagnostics), que incluye tratamiento con DNaseI para la eliminación del DNA contaminante. En todos los casos se tomaron las precauciones oportunas para evitar contaminaciones con Ribonucleasas (RNasas). La concentración y pureza del RNA se determinó por absorbancia (NanoDrop; ThermoScientific). A continuación, se realizó la transformación de 1µg del RNA a DNA complementario (cDNA) mediante retrotranscripción, utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (AppliedBiosystems), en un volumen final de 20µl y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 PCR cuantitativa a tiempo real

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados en este trabajo se analizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real, utilizando el cDNA obtenido según se ha descrito en el apartado anterior. Para las reacciones de qPCR se utilizó el kit *Quatimix Easy 47* (Biotools), con *Syber Green* (AppliedBiosystems) en un termociclador *LightCycler* (Roche Diagnostics). Los cebadores específicos (*primers*) utilizados para cada gen se detallan en la Tabla 2 (BonsaiBiotech). Para valorar la especificidad de los cebadores se analizaron los perfiles de desnaturalización(*melting*) determinados manteniendo la reacción a 80°C durante 10s con posterior calentamiento de la reacción hasta 95°C, en una tasa de calentamiento de 0.1°C/s; a lo largo de este proceso se midió la fluorescencia emitida. Con este análisis se verificó que cada par de cebadores producía un único producto de amplificación. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y Bromuro de Etidio (0.5 µg/mL) y se analizaron por trans-iluminación ultravioleta. En todos los casos se comprobó que, para cada par de cebadores, el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

Tabla 2. Cebadores utilizados para qPCR

Genes	Primer 5'-3'	Primer 3'-5'	Tm
β-Actina	GTCCACCTTCCAGCAGATGT	CATCTTCACCGTTCCAGTTT	60
18S	CGGCGACCCATTCTGAAC	GAATCGAACCCTGATTCCCCGTC	54
CD9	TAAAAGTGCAGCCGGAGACC	CGGCAAGCCAGAAGATGAAG	59
CD36	TAGAAGTTGCAAGTTGTCCTCG	ACTGTGTTGTCCTCAGCGTC	59
CD47	ACCTCCTAGGAATAACTGAAGTG	GGGTCTCATAGGTGACAACCA	59
CDH11	GGGCAGGCTTCATTGAGATA	GGCATGAATGTTCCCTGATT	56
EPCAM	CTGCCAAATGTTTGGTGATG	AGCCCATCATTGTTCTGGAG	58
Hif1α	AGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAA	CTGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCA	62
HLA-B	CTGAGATGGGAGCCGTCTT	TTCTCCTACACATCACAGCA	58
HLA-E	CTGGAGCCCCCAAAGACA	GTGTGATCTCCGCAGGGTAG	59
IL-10	ATGCCCCAAGCTGAGAACCA	TCTCAAGGGGCTGGGTCAGC	58
IRAK-3	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT	62
ITGAV	ATTTGATGCAACAGGCAATAGA	TTTATCCTGTTTCGACCTCACA	55
KLF4	ACCCACACAGGTGAGAAACC	ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC	60
KRT8	CCGCCTAAGGTTGTTGATGT	TGGAGCAGAACAAGATG	57
KRT18	CACAGTCTGCTGAGGTTGGA	CAAGCTGGCCTTCAGATTTT	58
KRT19	TGAGCAGGTCCGAGGTTACT	TCTTCCAAGGCAGCTTTCAT	54
NANOG	TGAACCTCAGCTACAAACAGGTG	AACTGCATGCAGGACTGCAGAG	61
OCT3/4	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	65
SOX2	AGAACCCCAAGATGCACAAC	CGGGGCCGGTATTTATAATC	57
SOX9	AGACCTTTGGGCTGCCTTAT	TAGCCTCCCTCACTCCAAGA	60
STC1	TTGACACTCAGGGAAGCA	CAGTGATGGCTTCAGGGTTC	57
VEGF	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	GCAGCGTGGTTTCTGTATC	60
Vimentina	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC	58

La cuantificación del cDNA de cada uno de los genes de interés se llevó a cabo utilizando una curva estándar de siete puntos, específica para cada gen. Sólo las curvas con coeficientes de correlación >0.98 fueron aceptadas como válidas. Además, en cada reacción de qPCR se incluyó un punto de la curva estándar. El programa con el que se analizó cada uno de los genes consistió en un paso de desnaturalización y activación de la polimerasa de 5 min a 95°C, seguidos de 45 ciclos a la temperatura de desnaturalización (Tm) específica para cada par de cebadores. Los resultados obtenidos

para cada uno de los genes analizados se normalizaron con respecto a la expresión de la β -Actina o el RNA mitocondrial 18S. Esta metodología ha sido usada por nuestro grupo en trabajos anteriores ^{103, 108, 193-196}.

3.6 Análisis por citometría de flujo

Para la tinción extra e intracelular se usaron los anticuerpos indicados en la Tabla 3, siguiendo un protocolo estándar. Se utilizaron controles de isotipo apropiados para cada experimento. Después de la tinción, las células fueron adquiridas por el citómetro de flujo BD FACS Calibur y los datos se analizaron usando FlowJo (FlowJo, LLC).

Tabla 3. Anticuerpos de citometría usados en este trabajo

Anticuerpo	Tipo de tinción	Casa Comercial
CD3	Extracelular	Inmunostep
CD14	Extracelular	Inmunostep
CD16	Extracelular	Inmunostep
CD36	Extracelular	BD Biosciences
CD56	Extracelular	Inmunostep
CD133	Extracelular	MiltenyiBiotec
CD163	Extracelular	BD Biosciences
HLA-DR	Extracelular	Inmunostep
PANK	Intracelular	MiltenyiBiotec
PDL-1	Extracelular	BD Biosciences
Perforina	Extracelular	BD Biosciences

El reactivo C11- BODIPY^{581/591} (Thermo Fisher) se utilizó para medir el estado de oxidación/reducción de las membranas celulares. Para ello se usa a una concentración de 1 μ M y se incuba durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. En el citómetro de flujo fue excitado a 488nm y los datos de emisión recogidos a 530nm (forma oxidada) y 585nm (forma reducida). Para reportar la proporción de oxidación/reducción de la membrana se usó el ratio 530/585 nm.

3.7 Recogida, aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Los *buffy-coats* se obtuvieron del centro de transfusiones de Madrid y fueron procesados en el momento de su llegada, a menos de 24h de la plasmaféresis. El aislamiento comienza con la suspensión en un tercio de su volumen final de Ficoll (GE Healthcare) y centrifugación a 1800 rpm sin freno durante 25 minutos a 24°C. Se obtiene un tubo con varias capas fácilmente diferenciables: el plasma (capa superior), los PBMCs (capa intermedia), el polímero sintético y los eritrocitos, granulocitos y células muertas (capa inferior). Se recoge la capa de PBMCs, lavándola varias veces con PBS para retirar todo el suero y ficoll remanente. Se miden las poblaciones de PBMCs por FACS y se siembran, en base al porcentaje de monocitos encontrado, en medio RPMI con antibióticos y sin suero. Tras una hora se comprueba la adhesión de los monocitos al fondo del cultivo y se lavan repetidas veces hasta que se ha desprendido la capa de células sin adherir del cultivo (con el resto de tipos celulares excepto los Mos). Con ello se obtienen unos porcentajes altos de enriquecimiento en Mos (>85%).

3.8 Fusión con polietilenglicol

Una vez obtenidos los dos tipos celulares que se usarán en la fusión (CSCs y Mos provenientes del Ficoll), se colocan en un mismo eppendorf al ratio deseado y se añade PEG (Sigma) al 35% en RPMI durante 5 minutos, a 37°C para minimizar la muerte celular. Luego se aplica un tratamiento con DNaseI (0.1% en MEM (Gibco)) durante 10 minutos y se cultivan en medio RPMI suplementado.^{197, 198}

3.9 Co-cultivo de líneas celulares

En el momento en que tenemos resuspendidas las células tumorales tanto en forma adherente como en CSCs, se cuentan y se colocan al ratio deseado en el pocillo donde tenemos sembrados previamente los Mos, en medio RPMI completo y suplementado.

3.10 Análisis de imagen por microscopías de fluorescencia y confocal

Para la tinción utilizamos protocolos clásicos para inmunohistoquímica de muestras incluidas en parafina u OCT y de muestras de inmunocitoquímica, que se

cultivan directamente en portaobjetos de cristal tratados o se fijan en ellos mediante citospin (SHANDON). Las inmunotinciones de hicieron siguiendo el protocolo descrito para cada anticuerpo (Tabla 4), utilizando medio de montaje VectaShield (Vector Laboratories).

Tabla 4. Anticuerpos usados para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en este trabajo

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
CD36	1:200	Abcam
CD14	1:500	Abcam
GFP	1:1000	Thermo Fisher
PANK	1:100	MiltenyiBiotec
Anticuerpo Anti-mouse IgA 594	1:200	Abcam
Anticuerpo Anti-rabbit IgG 488	1:750	Jackson immunoresearch
Anticuerpo Anti-rabbit IgG 647	1:400	Jackson immunoresearch

Por otro lado, se utilizaron dos matrices tisulares comerciales (*tissue arrays*) con muestras procedentes de biopsias humanas de pulmón. La primera (ab178194, Abcam), con muestras de 48 casos de tumores por duplicado y la segunda (LC817a, US BioMax), con 40 casos de tumor primario y sus correspondientes metástasis. En todos los casos la lectura se hizo en un microscopio confocal Leica TCS SPE.

3.11 Colorantes vitales

Marcamos las células con colorantes según el protocolo descrito por el fabricante (Vybrant® Multicolor Cell-Labeling Kit, Fisher). Para el ensayo de fusión se tiñeron las H460-CSCs con DIO y los Mos con DID. En los ensayos de competencia de fusión se tiñeron las H460 con DID y las H460-CSCs con DIO. Los resultados se recogieron mediante microscopía confocal y citometría de flujo a las emisiones de 501nm (DIO) y 665nm(DID).

3.12 Análisis de invasión

Utilizamos *transwells* con poros de 8µm (COSTAR) con una membrana de colágeno tipo I (2.4 µg/mL) y FBS como agente quimo-atrayente. La lectura de los resultados se efectuó 48h después de la inoculación por citometría de flujo semicuantitativa, utilizando una solución de microbolas sintéticas (reactivo D del kit

Mice CBA; BD Biosciences) como control de eventos. La migración (M) se calculó como el número de células migradas (B) en función del total de células tanto en el *transwell* (A) como migradas (B): $(M=[B/(A+B)]*100)$; véase Fig. 15A.

3.13 Análisis de capacidad formadora de tumores

Para llevar a cabo el modelo tumoral *in vitro* en tres dimensiones (3D), las células se aislaron previamente por marcaje de CD14⁺ y GFP⁺ mediante citometría de separación en la unidad SIDI de la Universidad Autónoma de Madrid, sembrándose $0.5*10^3$ células de las poblaciones celulares GFP⁺ y GFP⁺CD14⁺ en placas especiales de bajo anclaje de 96 pocillos con fondo redondo (Placas ULA, Cultek). Se centrifugaron a 1500 rpm para agregarlas y se incubaron en medio RPMI completo durante 7 días.

Las esferas formadas se pasaron a un pocillo de placas p96 de fondo redondo con una base de colágeno tipo I (1mg/mL). El área de los esferoides se evaluó usando un microscopio de contraste de fases, así como el programa de análisis LAS AF lite (Leica).

3.14 Estudio *in vivo* en ratones

Tras la separación por citometría de flujo, las poblaciones celulares GFP⁺ y GFP⁺CD14⁺ se inocularon a razón de $0.5*10^6$ células (en suero salino) a través de la vena de la cola, en ratonas inmunodeprimidas Foxn1^{nu} (nu/nu) atímicas. Se sacrificaron a dos tiempos: 3 y 6 semanas. Tras el sacrificio se fijaron los pulmones y ganglios axilares proximales al pulmón con PFA mediante protocolos estándar. Luego fueron incluidos en OCT y procesados para inmunohistoquímica.

Las ratonas se mantuvieron en condiciones de temperatura y luz controladas, con agua y comida *ad libitum*. Todos los diseños experimentales se hicieron siguiendo las normas aprobadas por el comité ético para la investigación animal del Hospital La Paz y del Instituto de Salud Carlos III ¹⁹⁹.

3.15 Ensayo de citotoxicidad y perforina

Las NKs expandidas se obtuvieron mediante el co-cultivo con la línea celular K562-mbII-15-4BBI (MTA del Dr. Antonio Pérez Martínez con el Dr. Darío Campana hospital de StJude Memphis) y PBMCs durante dos semanas en medio de crecimiento (Cellgenix) suplementado al 10% con FBS humano (Sigma). Durante la primera semana

se suplementó con IL-2 10IU/mL, aumentando a 100IU/mL la segunda semana. La expansión se monitorizó por citometría de flujo con los marcadores CD3⁻CD56⁺CD16⁺.

La citotoxicidad de las NKs se midió usando un ensayo de liberación de europio-TDA convencional durante 2h (Perkin-Elmer). La línea celular se marcó con TDA y se utilizaron células diana tumorales en proporciones Efector:Tumor (E:T) de 4:1, 2:1 y 1:1. El porcentaje de europio-TDA liberado se calculó utilizando la fórmula [(liberación experimental-liberación espontánea)/(liberación máxima-liberación espontánea)]*100%. La liberación espontánea no excedió de 14% de la liberación máxima en todos los experimentos.

En el ensayo del co-cultivo de las tumorales con NKs, la perforina se detectó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico.

3.16 Protocolo y análisis de RNA-seq

Después del tiempo de fusión, los co-cultivos fueron procesados por citometría de separación para obtener: Mos CD14⁺co-cultivados (co-CD14), células tumorales (GFP) e híbridos CD14⁺GFP⁺ (CD14/GFP); además se llevó un control paralelo de Mos aislados por adherencia (CD14-naïve). Las librerías de RNA-seq fueron preparadas usando el kit Truseq (Illumina) y secuenciadas en NextSeq500 (Illumina). El análisis se realizó con RTA v2.4.11 y bcl2fastq v2.18.0.2. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó en R, basado en todos los RNAm con una abundancia \geq RPKM 1. Los genes diferencialmente expresados se identificaron con DESeq2 en R ($\text{padj} \leq 0.001$). Los heatmaps se generaron con JAVATreeView 9. Las lecturas de RNA-seq se encuentran en el repositorio del NCBI GEO (GSE102512).

3.17 Cariotipado celular

El cariotipado de los Mos, H460-CSCs y GFP⁺CD14⁺ se hizo en el laboratorio de cariotipado de la Dra. Elena Mansilla en el INGEM, Hospital Universitario La Paz. Los diferentes cultivos se trataron durante 1 hora y 25 minutos a 37°C con 0.2mL de Colcemid. Tras dos lavados con EDTA se tripsinizaron las células y se les añadió CIK al 0.55%. Tras ello se fijó en metanol acético (3:1) y se tiñeron con Giemsa para visualizar el patrón de bandas G. Los datos fueron recogidos en cariotipador Cytovision (Leica).

3.18 Estudio de inhibición con siRNA

Los efectos de la regulación negativa de CD36 fueron estudiados con siRNAs específicos para CD36 (RNA directo: CACUAUCAGUUGGAACAGAtt (ID s2647), RNA reverso: UCUGUCCAACUGAUAGUGaa (ID 105938) de Ambion). Para la transfección se utilizó HiPerFect (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El ratio usado [(siRNA directo + siRNA reverso): HiPerFect] fue de [(2.5µg+2.5µg):12µL] en el caso de las células tumorales y [(0.5µg+0.5µg):6µL] en el caso de los Mos.

3.19 Estudio de inhibición con anticuerpos

En estos ensayos se usó el anticuerpo IgAα-CD36 (Abcam) a diferentes concentraciones, desde 0.3µL/mL a 1.3µL/mL, diluido en medio completo de RPMI y usando como controles anticuerpos no específicos.

3.20 Estudio de sobreexpresión con 4HNE

Para sobreexpresar CD36 en CSCs y Mos al unísono, usamos la solución del compuesto volátil 4HNE (Merck). Se inoculó rápidamente desde -80°C al medio RPMI suplementado, a concentraciones finales de 10 µM, 20 µM y 40µM.

3.21 Estudios de sobreexpresión

Para la sobreexpresión a nivel genético de CD36 se usó el plásmido pUNO1-hCD36 (Nucliber). Fue amplificado en *E. Coli* DH5α (Invitrogen) y purificado (2µg/µL) con el kit Maxi-prep (Qiagen) siguiendo los protocolos estandarizados. Las células fueron transfectadas a día 1 con Lipofectamine-LTX (Invitrogen) a la proporción [pCD36:Lipofectamine] de [5µg:12.5µL] en OptiMEM (Gibco) e incubadas en condiciones estándar durante 16 horas. También se utilizó Transfectosome (Nanovex Biotechnologies SL) en proporción de [0.2µg:0.6µL] diluido en 100 µL de Opti-MEM por pocillo, durante 16h.

La validación de la sobreexpresión de CD36 se hizo por citometría de flujo en todos los casos.

3.22 Tratamientos de cultivos celulares

La polarización estándar de los Mos se hizo con IFN-γ (0.5ng/mL) e IL-4 (8ng/mL) durante 48h, para polarizarlos a M1 o M2 respectivamente. También se

evaluaron los efectos de las LDL 50µg/mL (Sigma) y del lactato 24mM (Sigma) en Mo. Posteriormente se co-cultivaron con H460-CSCs haciendo un estudio del efecto hasta 5 días.

El estado oxidado/reducido se midió con C11-BODIPY y la polarización de los Mos se siguió con la expresión de los marcadores CD163 y HLA-DR.

3.23 Ensayos de “sangre total (*whole-blood*)”

Las sangres periféricas de los pacientes se recogieron en tubos EDTA, y se procesaron en menos de 24 horas desde la extracción. Las muestras se centrifugaron a altas revoluciones para posteriormente retirar el suero y lavar repetidas veces con PBS hasta eliminar el suero remanente. A continuación, para lisar los eritrocitos y fijar la muestra, utilizamos tampón “*lysis solution*” (BD Biosciences) para posteriormente marcar la muestra y cuantificarla por citometría.

3.24 Análisis estadístico

El número de repeticiones de cada experimento está indicado en la leyenda su correspondiente figura. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. Las significaciones estadísticas de los datos recogidos con un mínimo de 3 repeticiones fueron analizadas con t-test de una cola Mann-Whitney. Para las comparaciones entre tres o más grupos se utilizó análisis ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0.05$ y los análisis fueron realizados usando el software Prism versión 5.0.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Expresión de CD36 en el cáncer de pulmón

4.1.1 Meta-análisis de bases de datos

En un primer abordaje de la problemática de la fusión, decidimos realizar un análisis *in silico* de la expresión de CD36, por si pudiera estar involucrados en la misma. Para ello se utilizaron los datos registrados en la plataforma libre *cBioCancerGenomics*^{191, 192}, analizando una cohorte de 513 pacientes de cáncer de pulmón, que desarrollaron o no metástasis. Se detectó un aumento significativo en la expresión de CD36 en los pacientes que tuvieron metástasis (Fig. 4), en concordancia con el mal pronóstico asignado a este marcador en la bibliografía reciente¹⁹⁰.

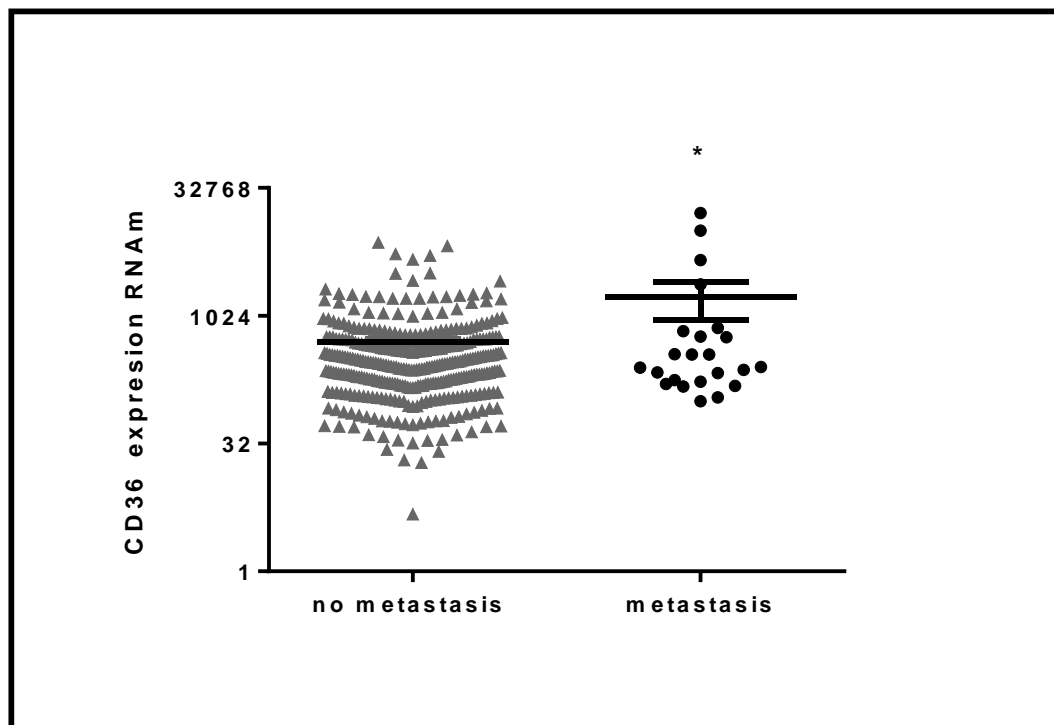


Figura 4. Meta-análisis de la expresión de CD36 en pacientes con cáncer de pulmón. Expresión de RNAm de CD36 en muestras procedentes de *cBioCancerGenomics*^{191, 192} de tumores primarios y metastáticos de pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n=513), t-test de dos colas ***, $p < 0,005$.

4.1.2 Análisis histológico de CD36 en pacientes

Las diferentes clasificaciones de la neoplasia de pulmón se centran en la gravedad de la enfermedad y la posibilidad de que ocurra la metástasis como suceso de mal pronóstico. Por ello la OMS incide en obtener una buena clasificación para así mejorar la sistematización de las investigaciones, lo que redundará en la supervivencia del paciente ¹⁴. De acuerdo con estas recomendaciones, realizamos un análisis de la expresión de CD36 siguiendo una clasificación exhaustiva de esta neoplasia. Así, se estudió la incidencia de CD36 en una matriz tisular (*tissue arrays*) de pacientes con diferentes estadios, grados y tipo de neoplasias, así como controles con un total de 87 muestras:

- Tejido sano control (n=4)
- Tejido inflamatorio (neumonía crónica, n=7)
- Carcinoma de célula escamosa (n=29)
- Carcinoma adenoescamoso (n=3)
- Adenocarcinoma (n=29)
- Carcinoma de célula pequeña (n=9)
- Carcinoma bronquioalveolar (n=1)
- Carcinoma de célula grande (n=1)
- Adenocarcinoma papilar (n=4)

La expresión detectada en tejidos normal e inflamatorio fue similar, y menor respecto del tejido tumoral. Sin embargo, no hubo una correlación estadística significativa entre la expresión de CD36 en los tumores primarios y el desarrollo de metástasis (Tabla 5, *Spearman Rho*=0,10; *p*=0,36)

Número de Muestra	CD36	Metástasis	Número de Muestra	CD36	Metástasis
1	-	+	45	-	-
2	+	+	46	-	-
3	+	+	47	-	-
4	+	+	48	-	-
5	+	+	49	-	-
6	-	+	50	-	-
7	+	+	51	-	-
8	+	+	52	+	-
9	-	+	53	+	-
10	-	+	54	+	-
11	+	+	55	+	-
12	+	+	56	+	-
13	+	+	57	+	-
14	-	+	58	+	-
15	+	+	59	+	-
16	+	+	60	+	-
17	+	+	61	-	-
18	+	+	62	+	-
19	+	+	63	+	-
20	-	+	64	+	-
21	-	+	65	+	-
22	+	+	66	+	-
23	+	+	67	+	-
24	-	+	68	+	-
25	-	+	69	+	-
26	+	+	70	+	-
27	+	+	71	+	-
28	+	+	72	+	-
29	-	+	73	+	-
30	+	+	74	+	-
31	+	+	75	+	-
32	+	+	76	+	-
33	+	+	77	+	-
34	+	+	78	+	-
35	+	+	79	+	-
36	+	+	80	+	-
37	+	+	81	+	-
38	+	+	82	+	-
39	+	+	83	+	-
40	-	+	84	+	-
41	-	+	85	+	-
42	+	+	86	+	-
43	+	-	87	+	-
44	-	-			

Tabla 5. Clasificación de las muestras de pulmón según la expresión de CD36 por inmunohistoquímica. Muestras 1-17 y 54-65 de carcinoma de célula escamosa (n=29), 18-35 y 66-76 de adenocarcinoma (n=29), 36-42, 80 y 81 de carcinoma de célula pequeña (n=9) 43-46 tejido control (n=4), 47-53 tejido inflamatorio (pneumonia crónica) (n=7), 82 de carcinoma bronquioalveolar (n=1), 77-78 de carcinoma adenoescamoso (n=3), 83 carcinoma de célula grande (n=1) y 84-87 adenocarcinoma papilar (n=4). (*Spearman Rho*=0,10; *p*=0,36). (positivas +; negativas -).

En la clasificación por tipo de tumor, encontramos diferencias entre todos ellos respecto al tejido normal (Fig. 5A). El mismo comportamiento se observó tras analizar las muestras por grado de tumor, a excepción del tejido metastático (Fig. 5B). En la clasificación por TNM se detectan diferencias con el control excepto para los tumores de grado T4 y las muestras metastáticas (Fig. 5C). La expresión de CD36 fue documentada mediante microscopía confocal (una selección de ella en la figura. 5D), encontrándonoslo más sobreexpresado en los tumores primarios de pacientes que desarrollaron metástasis, pero sin ser estadísticamente significativo. Estos datos nos indican la importancia de CD36 en el desarrollo de la enfermedad tumoral, pero sin ser concluyentes.

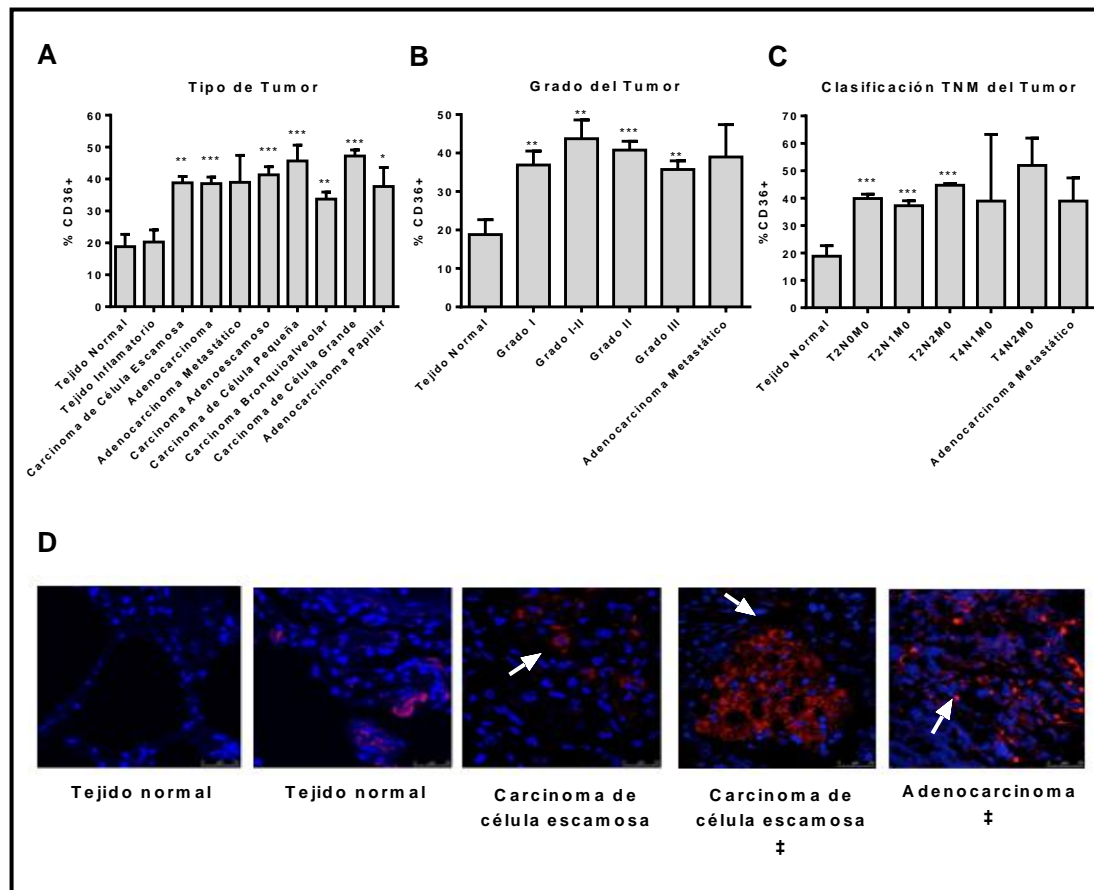


Figura 5. Estudio en pacientes del marcador CD36. Datos obtenidos en matrices tisulares, analizados con FIJI (ImageJ): (A) análisis por tipo de tumor (n=40, por duplicado), (B) análisis por grado del tumor (n=40, por duplicado), (C) análisis por TNM (n=40, por duplicado); t-test Mann Whitney de una cola, *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,005$. (D) Imágenes por microscopía confocal de diferentes tipos de tumores mostrando la expresión de CD36 (rojo) y núcleos (cian) (†, Muestras de pacientes que desarrollaron metástasis). (Escala 0-250µm).

4.2 Características troncales de las células madre aisladas de líneas tumorales

Las líneas celulares H460 y A549 de NSCLC, presentan subpoblaciones de CSCs que resultan adecuadas como modelo *in vitro* para el estudio del desarrollo de la metástasis y su problemática, ya que hay estudios que indican que su presencia o ausencia guarda relación directa con el pronóstico de la enfermedad²⁰⁰, además de la relación con marcadores de mal pronóstico (p.e. CD36)²⁹. En este trabajo contamos con una línea H460 transfectada, establemente por lentivirus, con GFP (H460-GFP). En experimentos puntuales en que la presencia de GFP interfería con otros marcajes, recurrimos a la línea no marcada. Por su parte, la línea A549 se utilizó sólo para validar los hitos más importantes encontrados con la H460.

Con ambas líneas, según las condiciones de cultivo, es posible seleccionar y aislar las poblaciones de CSCs (en adelante, H460-CSCs y A549-CSCs). Para el enriquecimiento en CSCs, el cultivo se crece durante 7 días en condiciones de no-adherencia, al cabo de los cuales ya es posible observar un aumento de la resistencia a la anoikis, una morfología muy parecida a la de células troncales y la formación de pequeños tumores ²⁹. Después de aplicar estos protocolos, los cambios morfológicos distintivos de CSCs fueron observados en nuestros cultivos, tanto para las H460-CSCs como para las A549-CSCs (Fig. 6).

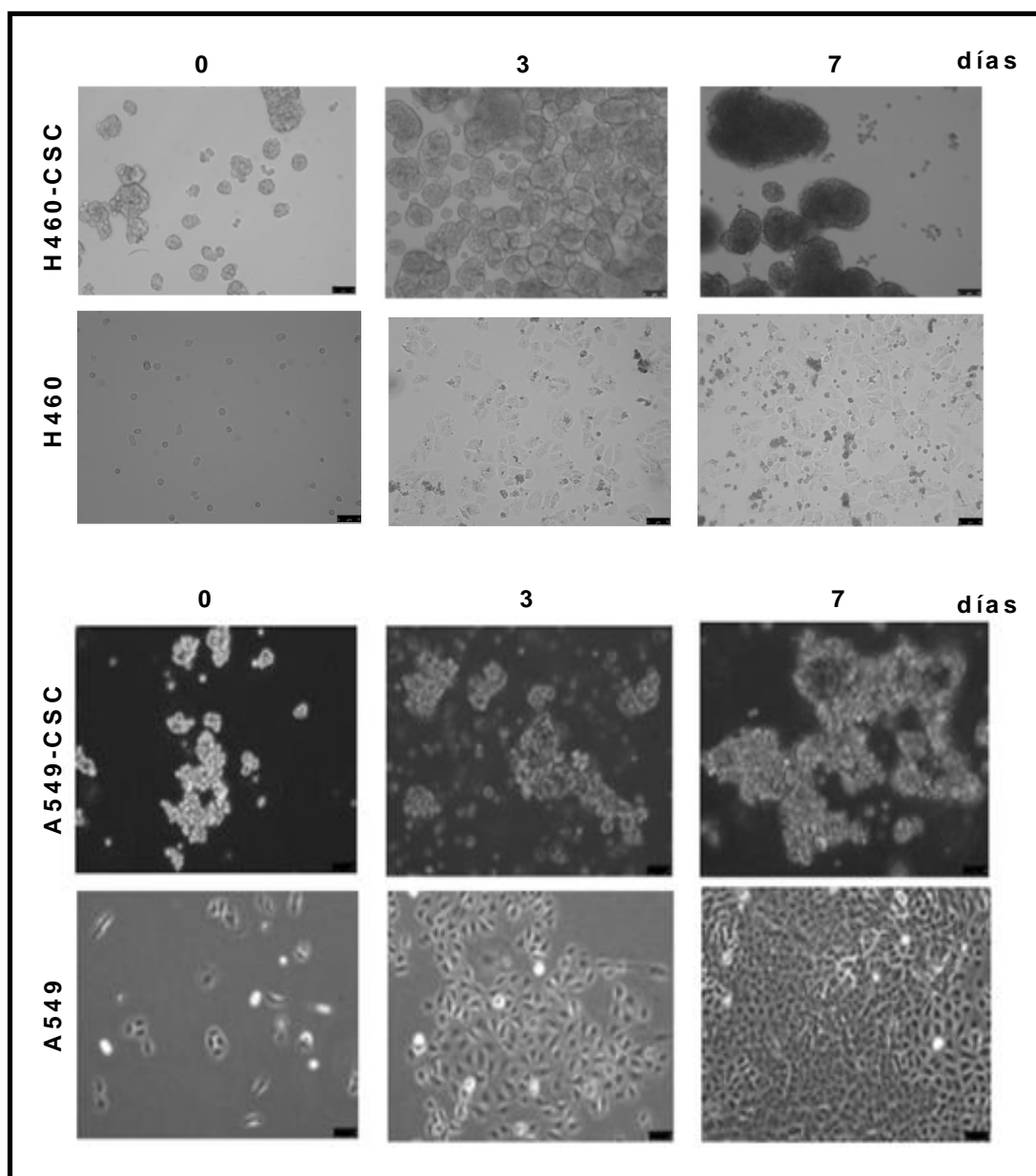


Figura 6. Evolución del cultivo celular en función del método selectivo. Fotos tomadas usando microscopía de contraste de fases a 0, 3 y 7 días, en condiciones para la selección positiva de CSCs y en condiciones de mantenimiento.

Para determinar si las diferencias morfológicas observadas entre las H460 y las H460-CSCs se correspondían con perfiles específicos de expresión de biomarcadores, se analizó la expresión de los mismos tanto a nivel transcripcional (RNA_m; q-PCR) como traduccional (proteína; FACS). La figura 7 muestra los resultados encontrados. En primer lugar, tras de 7 días de crecimiento se observa un claro patrón de expresión en las H460-CSCs de los principales factores de transcripción de troncalidad; a excepción de *NANOG* (cuyos niveles suelen ser elevados en células troncales embrionarias) los otros tres marcadores se encuentran sobreexpresados: *OCT3/4* (interviene en el

mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madres embrionarias), *KLF4* (promotor de la invasión y migración celular) y *SOX2* (altos niveles en células troncales y en bastantes tipos de tumores con alta incidencia de propagación) (Fig. 7A). Además, la elevada expresión (Fig. 7K) del marcador de célula troncal más utilizado, asociado a resistencia a agentes quimioterapéuticos basados en cisplatino, CD133^{201, 202}. Todo lo cual nos llevó a establecer en 7 días el tiempo óptimo de desarrollo de las H460-CSCs para el resto de experimentos.

Posteriormente, esta caracterización de las H460-CSCs se extendió a otros factores relacionados con las diferentes marcas distintivas del cáncer. Así, a nivel transcripcional se detectó una elevación de los niveles de RNAm (Fig. 7B-I) de *CD36* (relacionado con el mal pronóstico de la patología), *HIF1 α* (implicado en la progresión del tumor en condiciones de hipoxia además de promover angiogénesis²⁰³), *VEGF* (promotor de la renovación celular en cáncer y relacionado con CSCs), Vimentina (proteína expresada en células mesenquimales, relacionada con la progresión tumoral hacia la metástasis), *CD47* (altamente expresado en poblaciones CSCs, actúa como ligando de SIRP- α e inhibe la actividad fagocítica de células del sistema inmune a través de ésta²⁰⁴), *SOX9* (su inhibición reduce la formación de tumores y resistencia a quimioterapias), *CD9* (relacionado con la adquisición de quimioresistencia²⁰⁵) y una tendencia a la disminución de *IL-10* (correlaciona con la función antitumoral sobre el sistema inmune y su acción anti-inflamatoria en el tumor, promoviendo la progresión del cáncer hacia la metástasis²⁰⁶). Por otro lado, a nivel proteína se detectaron niveles altos de CD36, PanK y Vimentina (marcador mesenquimal de la TEM) y la disminución de E-Cadherina (Fig. 7L-N). Estos datos reafirman el patrón de expresión troncal de las H460-CSCs y sus diferentes marcadores.

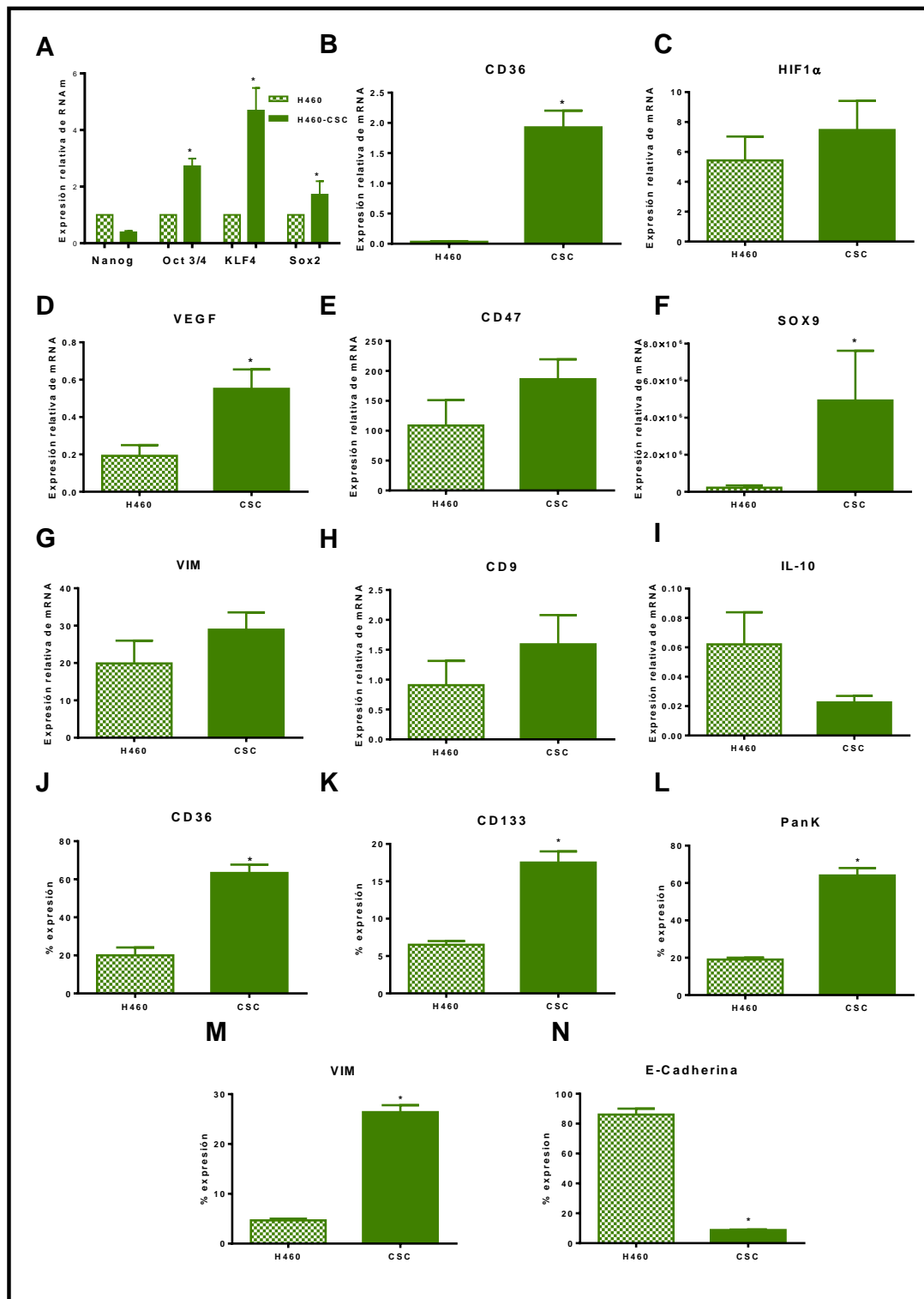


Figura 7. Diferencias en la expresión de marcadores entre H460 y H460-CSCs después de 7 días de cultivo. Expresión a nivel de RNAm de (A) factores de transcripción determinantes de la pluripotencia: *NANOG*, *OCT3/4*, *KLF4* y *SOX2*, (B) *CD36*, (C) *HIF1 α* , (D) *VEGF*, (E) *CD47*, (F) *SOX9*, (G) *Vimentina*, (H) *CD9*, (I) *IL-10* (n=4). Niveles de proteína obtenidas mediante FACS de (J) *CD36*, (K) *CD133*, (L) *PanK*, (M) *Vimentina*, (N) *E-Cadherina*. Expresión a nivel de RNAm de t-test Mann Whitney de una cola *, $p < 0,05$.

4.3 Determinación de la fusión celular *in vitro*

Para la comprobación de la teoría postulada por Aichel, se comenzó siguiendo un protocolo de co-cultivo entre células tumorales y mieloides (Fig. 8A), con el objetivo de comprobar si se producían células fusionadas y, en tal caso, su viabilidad. Se utilizó la población tumoral pura de CSCs debido a la importancia que tienen en la progresión del cáncer, a pesar de que ni en la hipótesis de fusión de Aichel, ni en estudios anteriores fueron consideradas.

Comenzamos con una población pura de células H460-CSCs-GFP, después de comprobar que no expresaban CD14 (Fig. 8B). Al co-cultivarlas con monocitos aislados de PBMCs, se detectó ~7% de población doble positiva GFP⁺CD14⁺, que a partir de ahora llamaremos **híbridos** (Fig. 8 C, D), en un ratio óptimo CSCs:Mos de 1:10, sin encontrarse porcentajes de células fusionadas mayores al 15% tras forzar el proceso de fusión con el tratamiento con PEG (Fig. 8E). Se demostró que al inicio de la interacción entre las CSCs y los Mos no existen híbridos en el co-cultivo (t=0) y que el tiempo óptimo de aparición de los mismos es de 4-5 días (t=96-120 horas) (Fig. 8F). También fue descartado un posible evento de fagocitosis de las tumorales, por los propios monocitos en cultivo, mediante un ensayo en que se enfrentó un lisado celular de H460-CSCs-GFP a monocitos, observando que los mismos no eran detectados por FACS de igual manera que las nuevas subpoblaciones encontradas (Fig. 8G). Este hito lo demostramos también mediante microscopía electrónica (Fig. 8H) y, más adelante, mediante cariotipado y un análisis masivo del transcriptoma (apartado 4.4.1). Por otro lado, se confirmó también la generación de híbridos entre H460-CSCs y Mos mediante tinción con colorantes vitales (Fig. 8I).

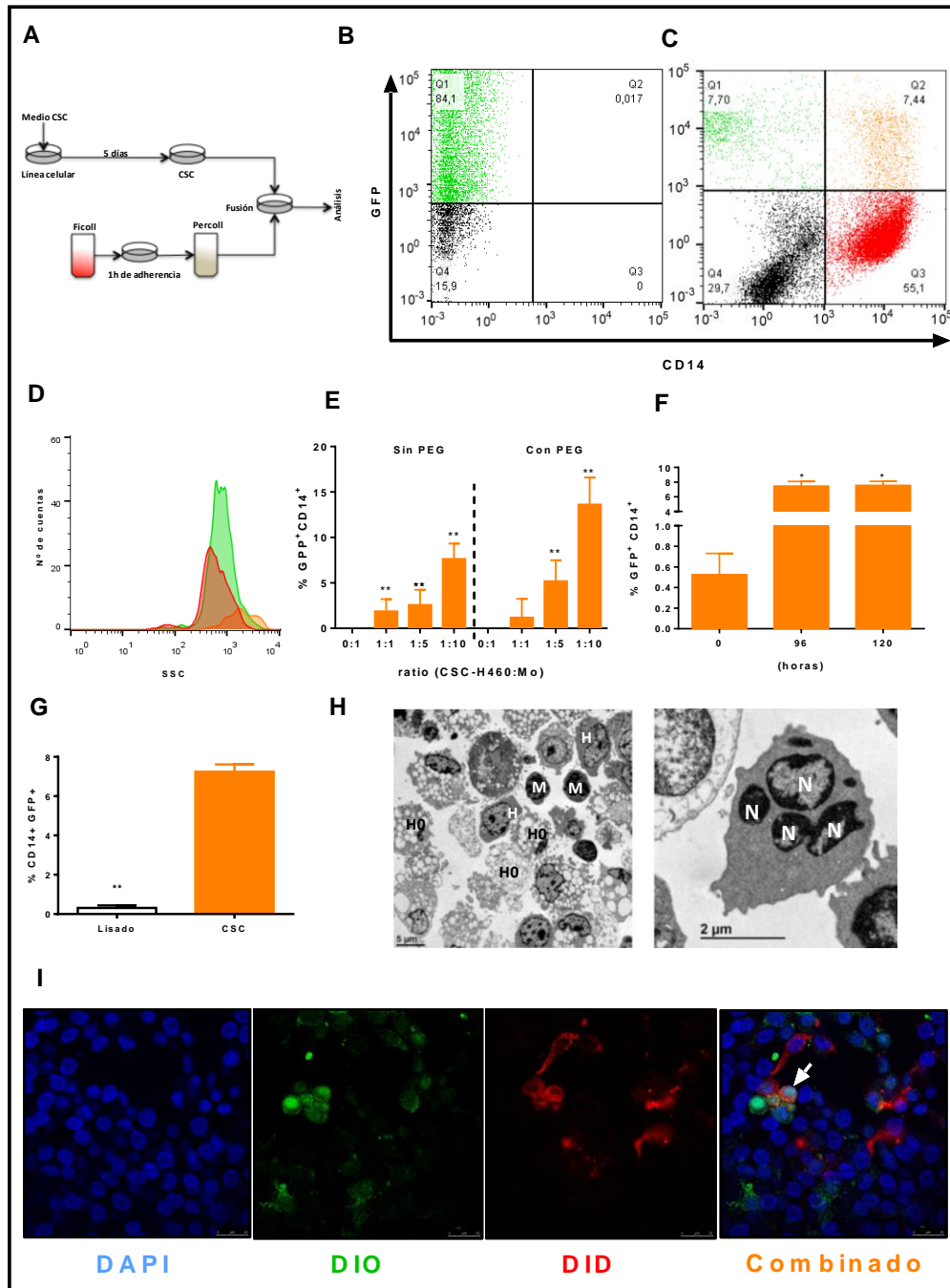


Figura 8 Fusión celular con la línea H460. (A) Esquema del proceso de co-cultivo entre CSCs y Mos. Espectros dot-plot obtenidos mediante FACS de (B) H460-CSCs y (C) H460-CSCs co-cultivadas con Mos siguiendo el diseño que aparece en A. (D) Histograma de los tres tipos celulares H460-CSCs (verde), Mo (rojo) e híbridos (naranja). (E) Porcentajes obtenidos mediante FACS de híbridos a diferentes ratios CSCs:Mos, con y sin tratamiento con PEG (n=6), (F) porcentajes a diferentes tiempos de cultivo (n=4) y (G) tras enfrentar los Mos a H460-CSCs viables y lisadas (n=4), t-test Mann Whitney de una cola *, p<0,05, **, p<0,01. (H) Imágenes de microscopía electrónica de los co-cultivos (imagen del cultivo completo (izquierda) y de híbridos polinucleados (derecha)) (N núcleo, M monocito, H H460, H0 muerte de H460). (I) Imágenes obtenidas por microscopía confocal teñido con colorantes vitales: núcleos (cian), H460-CSCs (verde), Mos (rojo), híbridos (amarillo). Escala 0-25µm.

Para validar que la fusión no constituía un hecho aislado de esta línea celular, se repitió el protocolo con la línea A549, comprobando primeramente que la misma tampoco expresaba el marcador CD14 (Fig. 9A). Al co-cultivar A549-CSCs y Mos (1:10) durante 4 días, se observaron porcentajes similares de fusión a los reportados con la línea H460 (Fig. 9 B, C). De manera quedaron establecidas las condiciones óptimas para estudiar la fusión celular *in vitro*: ratio CSCs:Mos de 1:10 y 4-5 días de co-cultivo.

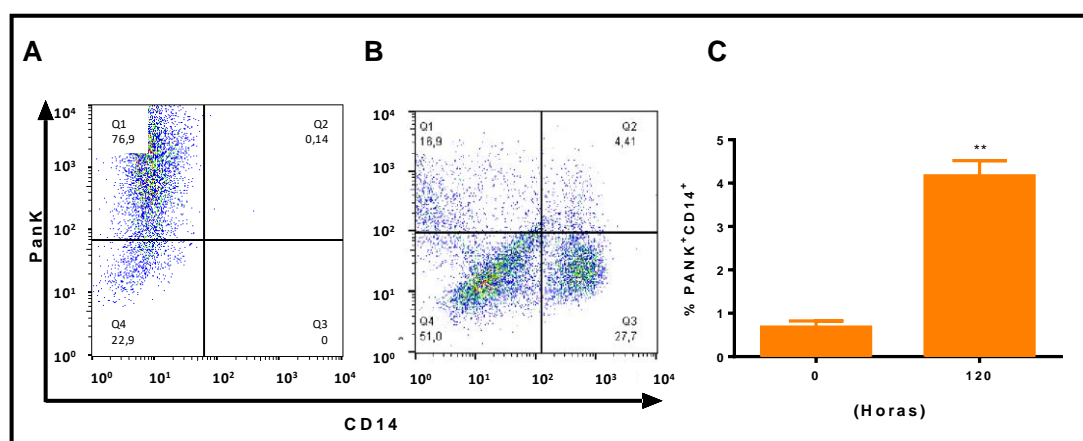


Figura 9. Fusión celular con la línea A549. Espectros dot-plot obtenidos mediante FACS de (A) A549-CSC y (B) A549-CSCco-cultivadas con Mos. (C) Porcentajes obtenidos mediante FACS de híbridos a 0 y 120 horas (n=9). t-test Mann Whitney de una cola **, $p < 0,01$.

A continuación, se estudió la especificidad de la interacción entre los Mos y las CSCs. Luego de co-cultivar los Mos en paralelo con H460 y H460-CSCs, sólo se detectaron híbridos en estos últimos (Fig. 10A). Igualmente, cuando se co-cultivaron los tres tipos celulares, tiñendo cada tipo de célula tumoral con diferentes colorantes vitales (Fig. 10B), se corroboró que las H460-CSCs eran la población que mayoritariamente se fusionaba con los monocitos (Fig. 10C-E). Asimismo, al usar otras poblaciones celulares de los PBMCs, linfocitos (CD3⁺) y neutrófilos (CD16⁺), no se detectaron híbridos con ninguna de ellas (Fig. 10F).

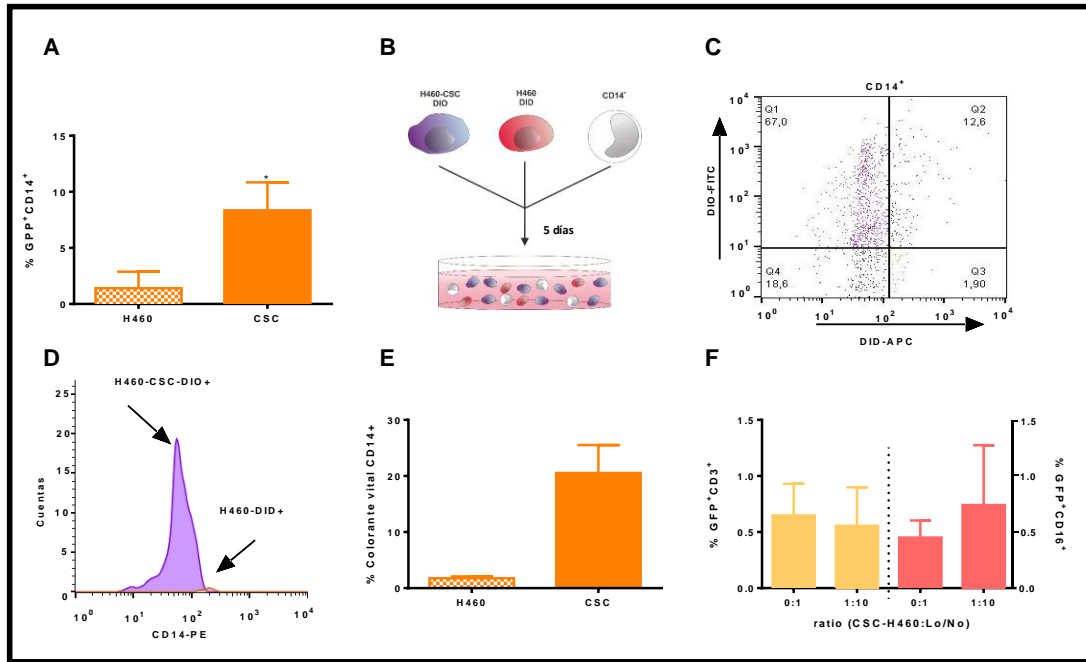


Figura 10. Fusión entre diferentes tipos celulares. (A) Análisis por FACS de los porcentajes de híbridos CD14⁺GFP⁺ tras co-cultivarlas con Mos con las dos poblaciones tumorales por separado (n=3). (B) Esquema del experimento de co-cultivo entre Mos y las tumorales con los diferentes colorantes vitales (DID, DIO), (C) espectros dotplot obtenidos mediante FACS (DID-H460-CSCs vs DIO-H460), (D) histograma de los dos tipos celulares con H460-CSCs (morado) y H460 (rojo), (E) porcentaje de células híbridas (CD14⁺H460 DID⁺/ CD14⁺H460-CSCs DIO⁺) (n=2), (F) híbridos CD3⁺/CD16⁺GFP⁺ tras co-cultivarlas con LΦ/NΦ a diferentes ratios (n=6), t-test Mann Whitney de una cola *, p<0,05.

4.4 Caracterización de los híbridos

4.4.1 Entidad de los híbridos

Una vez validada la existencia y origen de esta población híbrida CSCs-Mos (GFP⁺CD14⁺), realizamos una caracterización minuciosa de los tres tipos celulares tanto morfológica como genéticamente. Iniciando el estudio desde un punto de vista morfológico, se observó que los híbridos presentaban una mayor pérdida de adherencia (Fig. 11), relacionándose con la transición epitelio-mesenquimal.

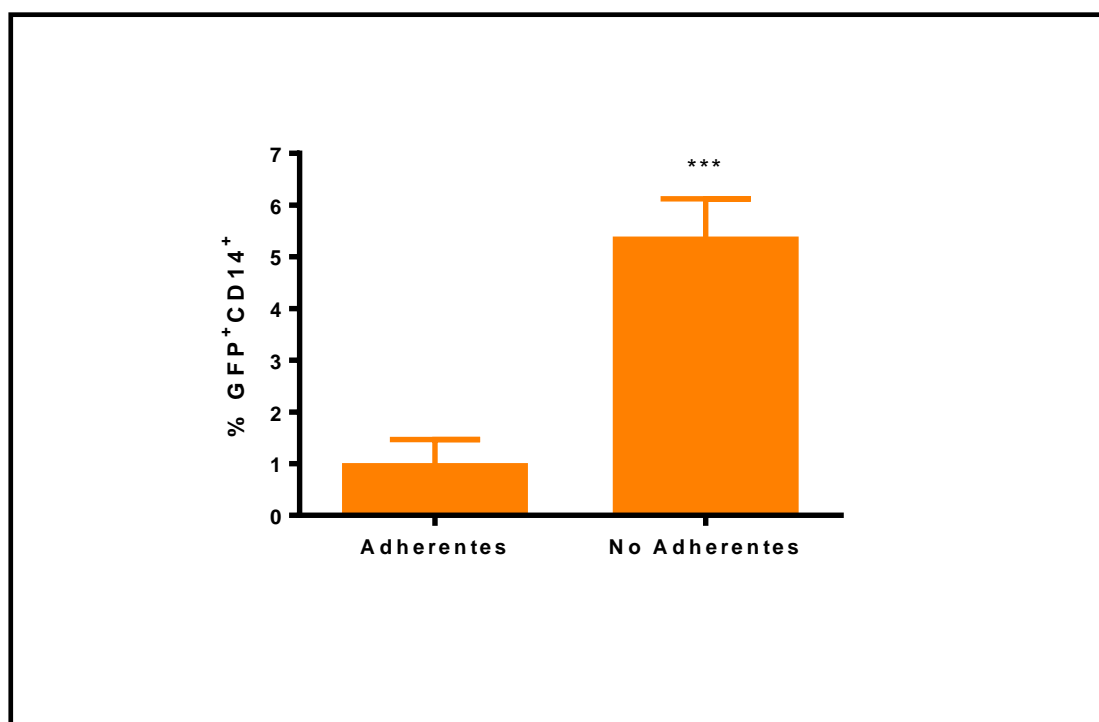


Figura 11. Adherencia de las células híbridas. Híbridos CD14⁺GFP⁺ adherentes y no adherentes obtenidos tras el co-cultivo de CSCs y Mos (n=5), t-test Mann Whitney de una cola ***, P<0,005.

Desde un punto de vista genético, para elucidar la identidad de los híbridos como nueva entidad celular, única y diferente de sus parentales, se realizó el cariotipado de las tres poblaciones celulares en el co-cultivo, aisladas por citometría de separación (Fig. 12). Se observó que mientras los Mos (CD14⁺) presentaban un cariotipo normal (Fig. 12A), las células tumorales (GFP⁺) exhibían muchas aberraciones cromosómicas, desde aneuploidías a trisomías y tetrasomías (Fig. 12B). Sin embargo, en los híbridos (Fig. 12C) no existe trisomía del cromosoma 16 y el cromosoma aberrante A tiende a desaparecer. Por otra parte, este ensayo descarta la existencia de un proceso de fagocitosis.

Posteriormente realizamos una secuenciación masiva de RNA de las tres poblaciones celulares, separadas por citometría de flujo tras la fusión. El análisis primario de componentes principales (PCA; Fig. 13A) reveló diferencias significativas en los perfiles de expresión génica de los diferentes tipos celulares, corroborándolo con el posterior Heat-map (Fig. 13B) y sus correspondientes análisis de los diferentes grupos génicos encontrados (Fig. 13C). Destaca la diferencia que encontramos entre el grupo de células híbridas y los otros dos tipos celulares del co-cultivo (Mos y CSCs)

(Fig. 13D, E), reafirmando la existencia de esta nueva población y sus diferencias. Esta se encuentra enriquecida en genes de tipo inmunológico y oncológico (Fig. 13F).

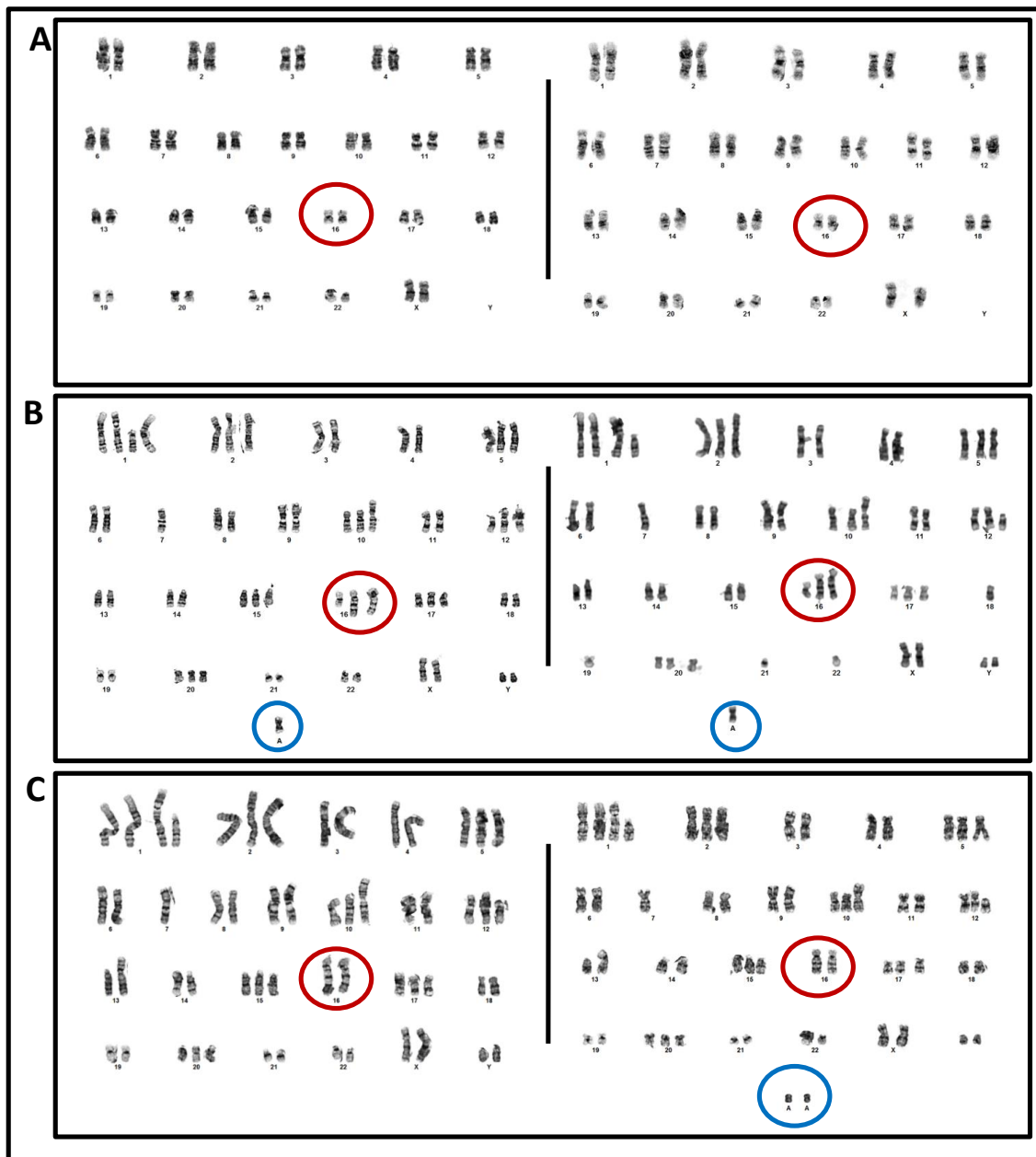


Figura 12. Cariotipado de las diferentes poblaciones separadas por citometría. Cariotipo de (A) Mos (B) H460-CSCs y (C) células híbridas CD14⁺GFP⁺. Cromosoma 16 (rojo), cromosomas aberrantes (azul). Metafases contadas >20.

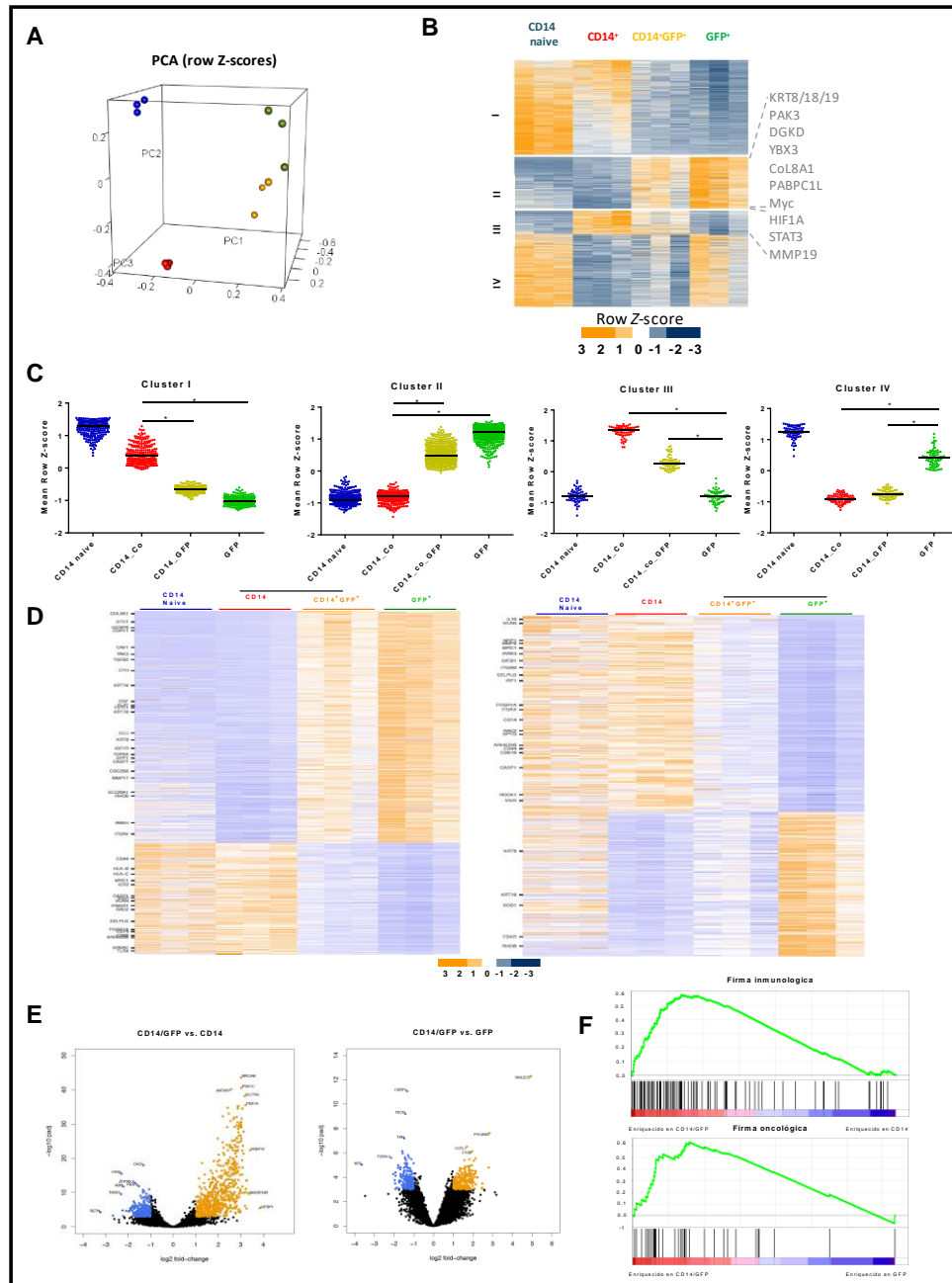


Figura 13. Secuenciación masiva de RNA. Análisis de la secuenciación masiva de RNA por (A) componentes principales, (B) Heat-map, y (C) los clusters identificados en B, de las poblaciones (CD14⁺naive, azul; CD14⁺, rojo; CD14⁺GFP⁺, amarillo; GFP⁺, verde). OneWay ANOVA *, P<0,05. Análisis de las diferencias entre las CD14⁺GFP⁺ y los demás tipos celulares co-cultivados por (D) Z-score heat-maps mostrando diferencias de expresión génica entre CD14⁺ frente CD14⁺GFP⁺ (izquierda) y GFP⁺ frente CD14⁺GFP⁺ (derecha). (E) volcano plots enfrentando células híbridas frente a Mos (izquierdo) y células híbridas frente a CSCs (derecho). (F) Expresión de las diferentes marcas genéticas enriquecidas por análisis GSEA en las CD14⁺GFP⁺ respecto a los demás tipos celulares, en genes de procesos inmunológicos (GSE30962 PRIMARY VS SECONDARY ACUTE LCMV INF CD8 TCELL_UP, M5041, gráfica superior) y en genes de vías de señalización oncológicas (KRAS.LUNG_UP.V1_UP, M2897, gráfica inferior).

Algunas de las principales diferencias significativas en los perfiles de expresión génica encontrados se validaron por qPCR. Los transcritos sobreexpresados en los híbridos y las tumorales correspondían a genes involucrados en rutas de cáncer y metástasis, destacando Vimentina, CD47 y el aumento de las citoqueratinas (Fig. 14A-K). Por otro lado, los que se sobreexpresan comúnmente en híbridos y Mos, pertenecen a vías inmunológicas tales como HLA-B y HLA-E, y de escape a la respuesta inmune (Fig. 14L-N).

Tras el análisis por citometría de flujo, observamos en las células híbridas la expresión de marcadores relacionados con el sistema inmune como CD163 (marcador de Mos M2) (fig. 15A), que probablemente les confiera una actividad protumoral a través de la inhibición del inductor de la apoptosis TWEAK²⁰⁷, y el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (Fig. 15B), confiriendo a los híbridos un mecanismo de escape del sistema inmune²⁰⁸. Finalmente, encontramos la expresión de las proteínas de superficie Pank (fig. 15C) y CD36 (Fig. 15D) en estas células híbridas, facilitándonos así una firma específica de marcadores que, junto a CD14, nos faciliten la identificación de estas en tejido y en circulación (apartado 4.6).

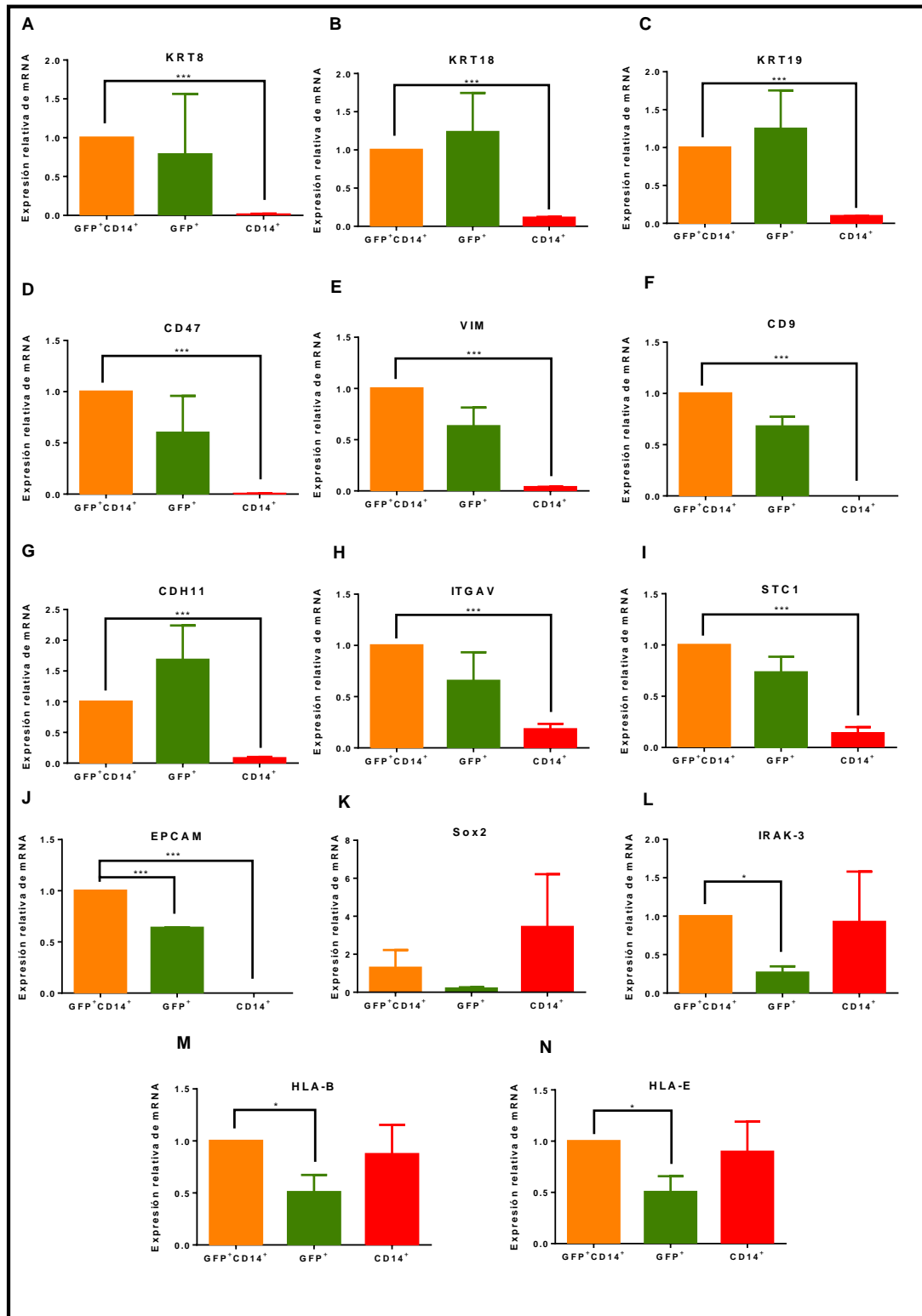


Figura 14. Validación de los datos obtenidos en la secuenciación masiva de RNAm. RNAm de las principales variaciones genéticas encontradas en la secuenciación (A) KRT8 (B) KRT18 (C) KRT19, (D) CD47, (E) VIM, (F) CD9, (G) CDH11, (H) ITGAV, (I) STC1, (J) EPCAM, (K) SOX2, (L) IRAK-3, (M) HLA-B, (N) HLA-E, t-test de doble cola, *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.005$.

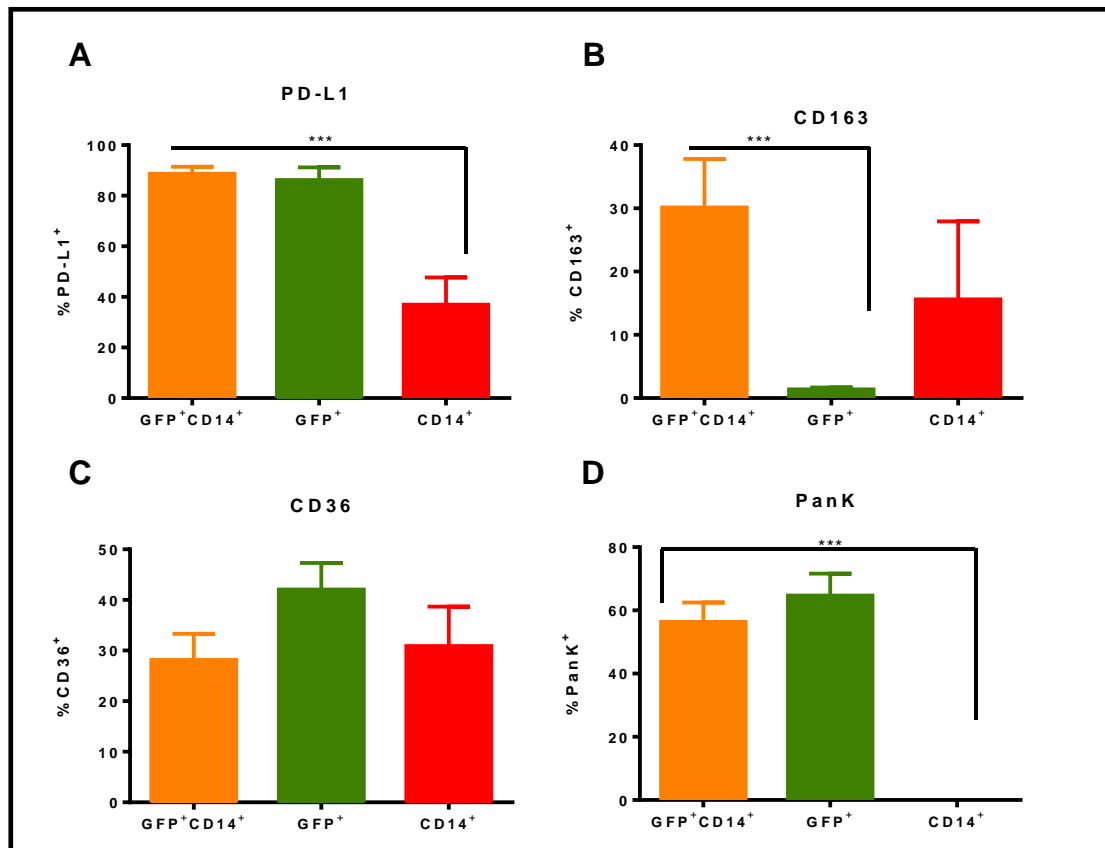


Figura 15. Marcadores de las diferentes poblaciones aisladas por citometría de separación. (A-D) Porcentajes de expresión de proteínas en las diferentes poblaciones (n=4) t-test Mann Whitney de dos colas *, p<0,05, **, p<0,01.

4.4.2 Funcionalidad

Para estudiar la adquisición o mejora de las marcas distintivas del cáncer por parte de los híbridos, se estudió primeramente la ganancia de propiedades invasivas debida a la pérdida de adherencia, ya que este es uno de los primeros eventos del proceso metastático. Mediante un ensayo *in vitro* (Fig. 16A) con la línea H460-CSC, se observó un aumento de la capacidad migratoria de los híbridos con respecto a las CSCs (Fig. 16B). Estos resultados fueron corroborados con la línea A549-CSC (Fig. 16C).

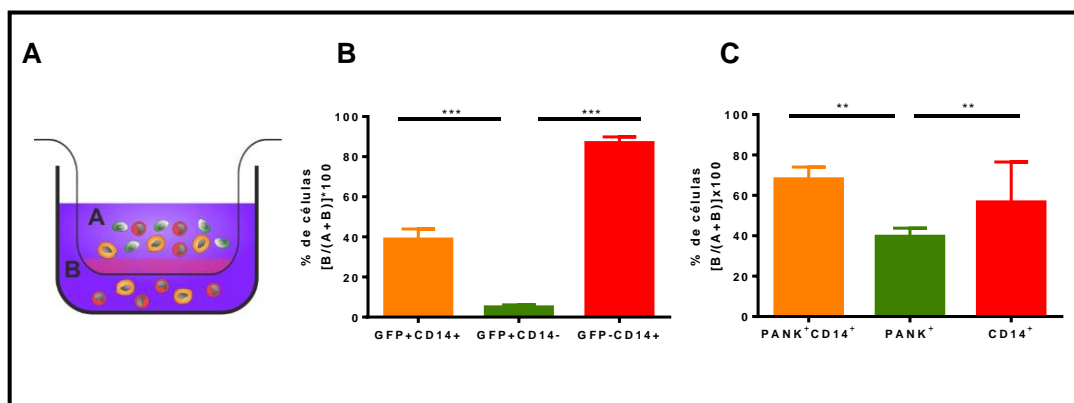


Figura 16. Invasión de las diferentes poblaciones celulares. (A) Esquema de trabajo del análisis de movilidad. Migración medida como $[B/(A+B)] \times 100$ de los co-cultivos de Mos con (B) H460-CSCs y (C) A549-CSCs. (n=3) One-Way ANOVA **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

A continuación, para evaluar el crecimiento tumoral tras la invasión, diseñamos otra estrategia *in vitro* que se acercara lo más posible a las condiciones fisiológicas (Fig. 17A), que consistió en dejar crecer las GFP⁺ y los híbridos, previamente separados por sorter, en placas de cultivo y luego trasplantarlas a matrices de colágeno. Se observó un incremento en el diámetro de los tumores de ambas poblaciones tras 14 días de cultivo (Fig. 17B) aunque mayor en el caso de los híbridos. Después de incluirlos en la matriz, también los híbridos mostraron una mayor expansión (Fig. 17C).

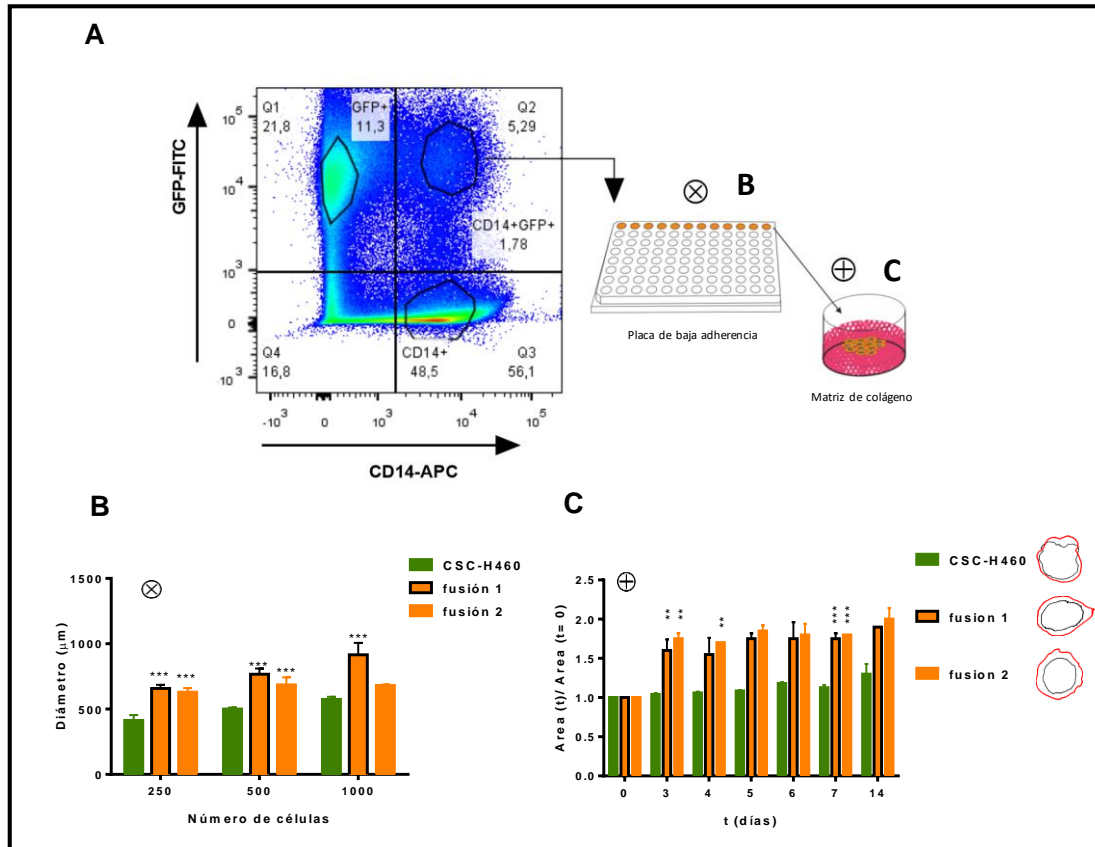


Figura 17. Capacidad formadora de tumores y expansión. (A) Esquema de trabajo para el análisis de tumorigenicidad. (B) Variación del diámetro (μm) de los tumores formados en placas de no adherencia (A x) de los híbridos y las CSCs tras 7 días de cultivo (n=3). (C) Área normalizada a tiempo 0 de los tumores formados y embebidos en matriz de colágeno (A +) hasta los 14 días (n=2) one-way ANOVA/Tukey's **, p<0,01, ***, p<0,001.

Otra marca distintiva evaluada fue la capacidad de los híbridos para evadir la vigilancia del sistema inmune, con respecto a las CSCs. Para ello, se enfrentaron ambos tipos celulares a NKs (CD3⁻CD56⁺CD16⁺) previamente activadas (Fig. 18A). Se detectó una disminución en la secreción de perforina frente a los híbridos (Fig. 18B), así como un menor porcentaje de lisis por parte de las NKs (Fig. 18C).

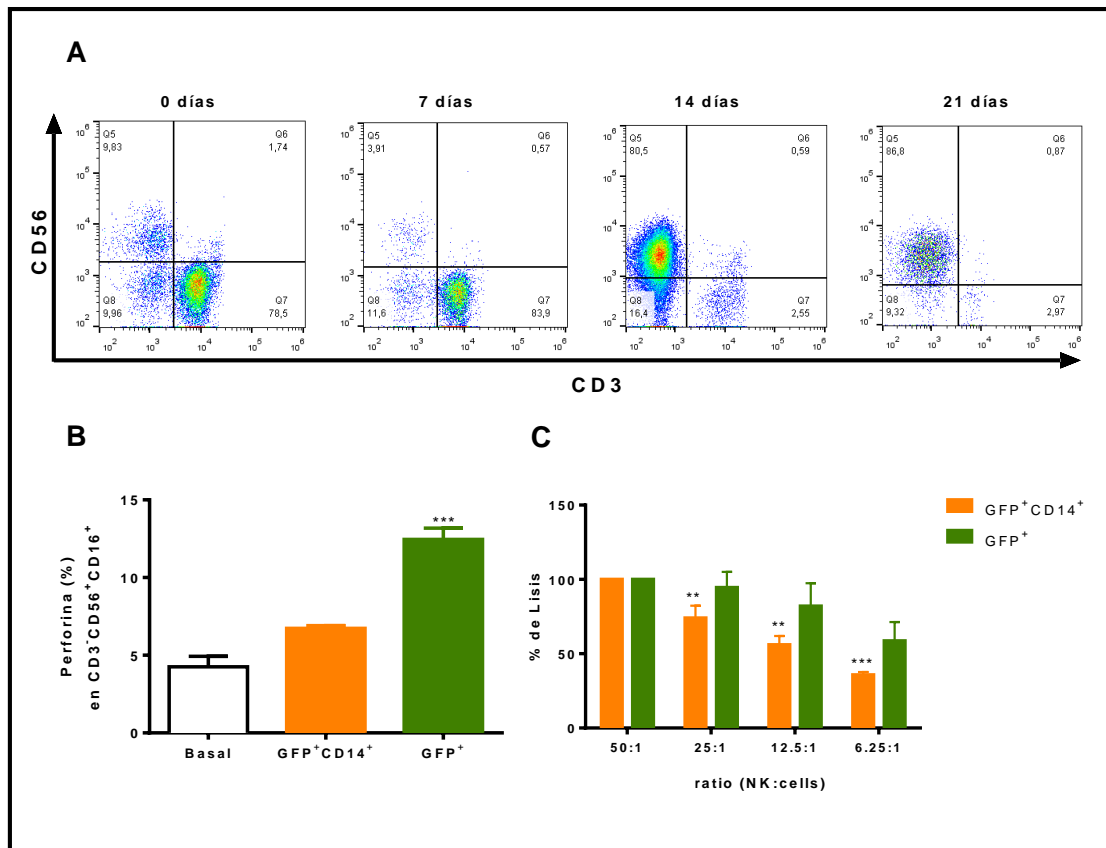


Figura 18. Inmunogenicidad de las diferentes poblaciones. (A) Espectros dotplot obtenidos por FACS de las células NKs a lo largo del tiempo de activación, haciendo el seguimiento a través de detección por citometría de la población CD56⁺CD3⁺. (B) Porcentaje de perforina en células NKs de las diferentes poblaciones (n=4). (C) Porcentaje de lisis producida por NKs (n=6) one-way ANOVA/Tukey's **, p<0,1, ***, p<0,005.

Para evaluar si la adquisición de marcas distintivas influiría en la capacidad metastática de los híbridos, se realizó un abordaje *in vivo* utilizando un modelo (ratonas Foxn1^{nu}) previamente descrito con H460-CSCs ²⁹. Se inocularon vía cola las poblaciones aisladas de GFP⁺ e híbridos (Fig. 19A) y pasadas 3 ó 6 semanas, fueron sacrificadas para el análisis histológico de pulmones y ganglios mediante inmunohistoquímica. A 3 semanas se observaron ambas poblaciones asentadas en el pulmón (Fig. 19B). Sin embargo, a las 6 semanas sólo se detectó la población de híbridos tanto en ganglios como en pulmones (Fig. 19C, tabla 6).

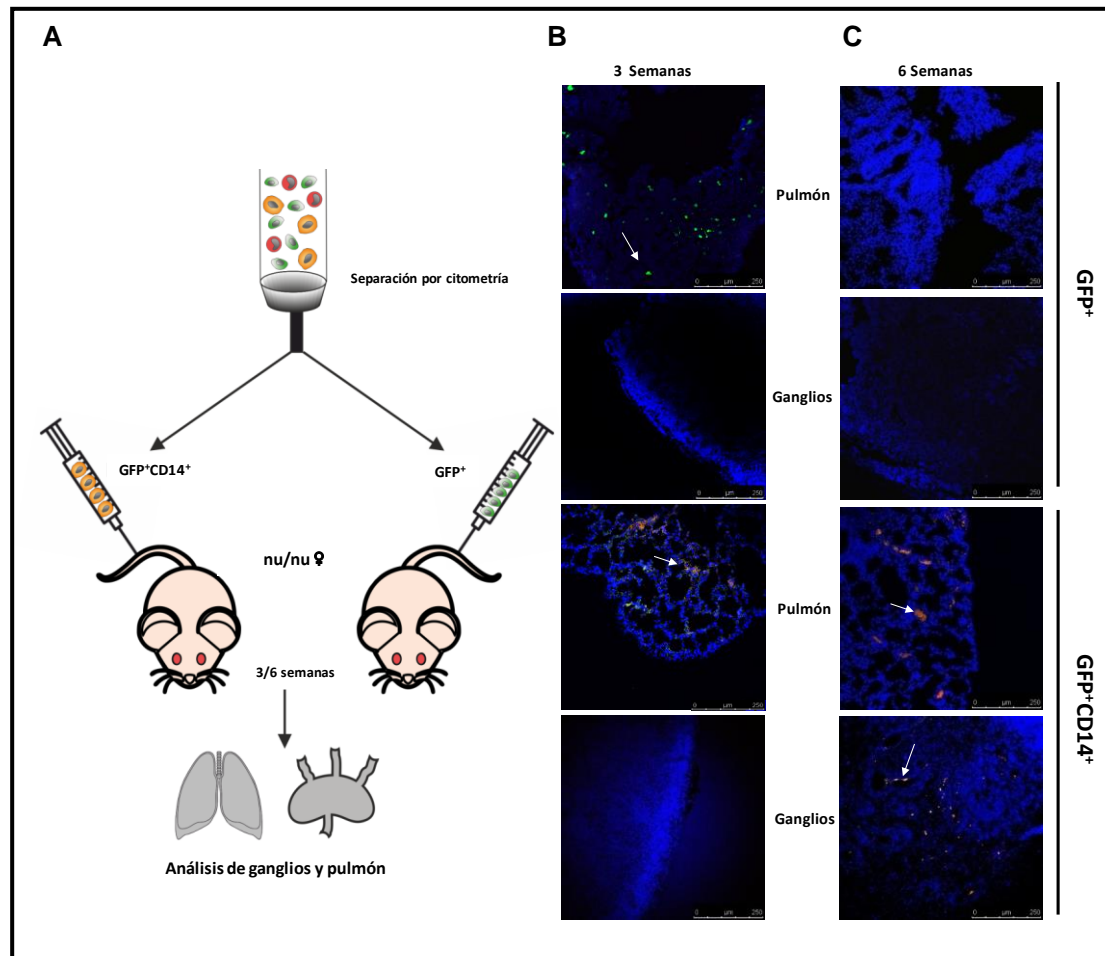


Figura 19. Capacidad invasiva *in vivo* de los híbridos. (A) Esquema del ensayo. Imágenes por microscopia confocal de pulmones y ganglios de ratón, (B) tras 3 semanas de inoculación (CSCs-H460 n=5 y GFP⁺CD14⁺ n=11) y (C) tras 6 semanas de inoculación (CSCs-H460 n=5 y GFP⁺CD14⁺ n=10), núcleos (cian), GFP-H460-CSCs (verde), CD14 (rojo), células híbridas (amarillo). (Escala 0-250µm)

	3 Semanas		6 Semanas	
	GFP	GFP/CD14	GFP	GFP/CD14
Pulmón	+	+	-	-
	+	+	-	-
	+	+	-	-
	-	-	-	-
	+	+	-	-
		+		-
		-		-
		-		-
		+		-
		-		-
		-		-
		-		-
Ganglios	-	-	-	+
	-	-	-	+
	-	-	-	+
	-	-	-	-
		-		-
		-		+
		-		-
		-		+

Tabla 6. Valoración de pulmón y ganglios. Muestras de pulmón y ganglio de ratón recogidas a 3 y 6 semanas y valoradas por inmunohistoquímica (positivas +; negativas -).

4.5 Papel de CD36 en la formación de los híbridos

4.5.1 Sobreexpresión de CD36

Para elucidar el mecanismo responsable de la fusión, comenzamos estudiando CD36 como posible proteína implicada en el proceso, debido a su papel tanto en la fusión, como en el pronóstico de la enfermedad. Primeramente se provocó la sobreexpresión de CD36 en todos los componentes celulares del co-cultivo mediante la adición de 4HNE (4-hidroxinonenal), un agente químico que actúa vía *NRF2* en la sobreexpresión de CD36²⁰⁹. Se detectó un aumento creciente de la expresión de CD36 según se incrementaba la concentración de 4HNE (Fig. 20A), con el consecuente aumento en la fusión celular (Fig. 20B).

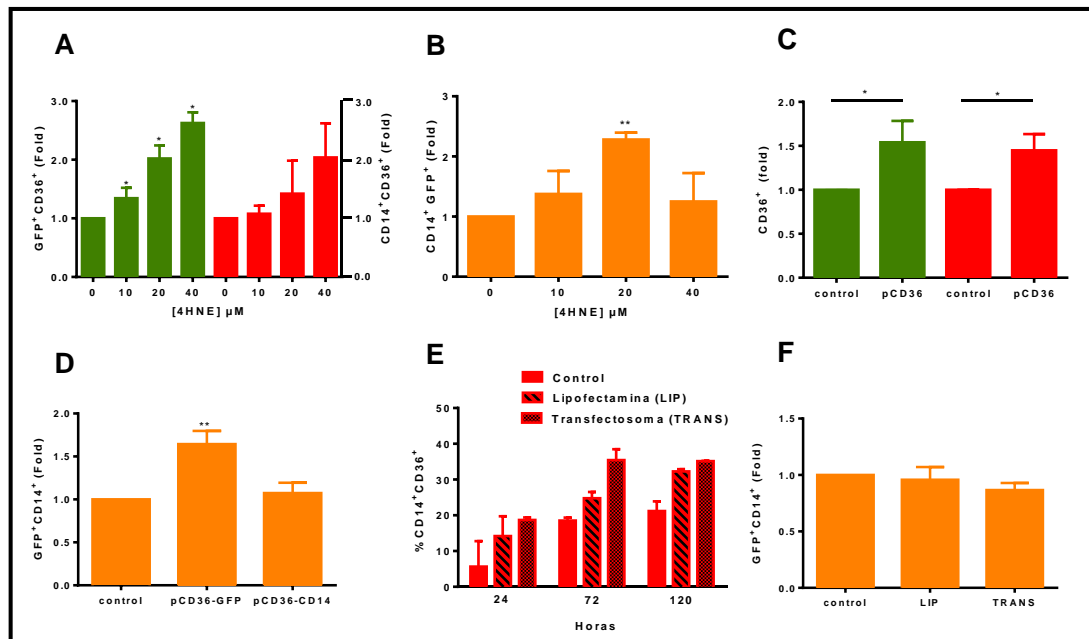


Figura 20. Sobreexpresión de CD36 en monocitos y H460-CSC. (A) Parámetros tras los tratamientos de 4HNE, midiendo el porcentaje de sobreexpresión de CD36 en CSCs (verde) y Mos (rojo) (n=3) t-test Mann Whitney de una cola *, $p < 0,05$. (B) Porcentaje de población híbrida CD14⁺GFP⁺ tras el tratamiento (n=3) one-way ANOVA/Tukey's *, $p < 0,05$. (C) Porcentaje de sobreexpresión de CD36 en CSCs (verde) y Mo (rojo) tras el tratamiento con pCD36 (n=3) t-test Mann Whitney de una cola *, $p < 0,05$. (D) Población híbrida normalizada CD14⁺GFP⁺ tras el tratamiento (n=3). (E) Porcentaje de sobreexpresión de CD36 en Mos con diferentes tratamientos de transfección (n=2). (F) Población CD14⁺GFP⁺ tras co-cultivar los Mos tratados con H460-CSCs (n=2) one-way ANOVA/Tukey's **, $p < 0,01$.

A continuación, se utilizó un plásmido comercial de sobreexpresión (pCD36) para transfectar (lipofectamina) los dos tipos celulares. A pesar de que la transfección fue exitosa en ambos casos (Fig. 20C) sólo se observó un incremento de la fusión con la sobreexpresión de CD36 en las CSCs (Fig. 20D). Aún realizando un segundo protocolo de transfección (transfectosome) en los Mos y observándose una mayor sobreexpresión de CD36 (Fig. 20E), no se detectó variación alguna en la fusión con respecto al control (Fig. 20F).

4.5.2 Inhibición de la expresión de CD36

Se realizó un ensayo de silenciamiento con siRNA-CD36 tanto en H460-CSCs como en Mos, comprobándose la reducción en la expresión de CD36 en ambos tipos celulares (Fig. 21A).

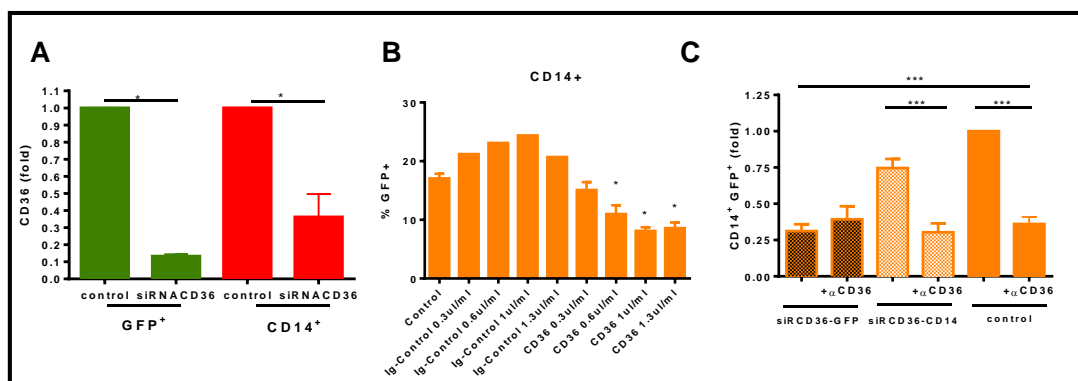


Figura 21. Inhibición de CD36 en monocitos y H460-CSC. (A) Porcentaje de expresión de CD36 normalizada por citometría de flujo de las poblaciones GFP⁺ y CD14⁺, con y sin siRNA-CD36 (n=3), (B) Porcentaje de población híbrida CD14⁺GFP⁺ tras tratamiento con anticuerpo inhibidor para CD36 frente a IgG (n=3) y (C) porcentaje de población híbrida CD14⁺GFP⁺ con tratamiento combinado de siRNA-CD36 y α -CD36 (n=6), t-test Mann Whitney de una cola *, p<0,05, **, p<0,01.

Se comprobó también el efecto de un anticuerpo α -CD36 en la expresión de CD36, tanto por las CSCs como los Mos, después de determinar la concentración óptima a utilizar para inhibir una fusión estándar (dosis más efectiva: 1 μ L/mL; Fig.21B). De manera que el efecto de α -CD36 en la fusión fue estudiado tanto en co-cultivos control como en co-cultivos en los que uno de los dos tipos celulares había sido previamente silenciado con siRNA-CD36. Se corroboró así que la inhibición de CD36 provoca una disminución en el rendimiento de híbridos sólo si se ha producido en las CSCs (Fig.21C).

4.5.3 Mecanismos moleculares reguladores de la fusión

Teniendo en cuenta la afinidad de CD36 por las moléculas oxidadas²¹⁰⁻²¹³, estudiamos el estado oxidativo de los Mos. Comenzamos tratando los Mos con dos controles químicos con elevado poder reductor (Tocoferol) y oxidante (complejo Cumene/Hemina)²¹⁴, midiendo el estado de oxidación/reducción de las células utilizando *C-11 BODIPY* (marcador para seguir los niveles de oxidación/reducción celular mediante FACS²¹⁵) (Fig. 22A). Una vez validado nuestro método, continuamos

manipulando el metabolismo intermedio de los Mos con LDL y lactato, ambos compuestos biológicos del microambiente tumoral (Fig. 22B), encontrando que tras el tratamiento aumenta el estado de oxidación/reducción de los Mos. A continuación medimos la expresión del biomarcador CD163 (característico del fenotipo M2 ²¹⁶) tras los tratamientos (Fig. 22C), observándose que el LDL los polariza a un fenotipo M2 a 120h, en contraste con el lactato, que sólo producía esta polarización si se añadía durante las últimas 16h del cultivo, no así si se mantenía durante las 120h del tratamiento, en cuyo caso el fenotipo se revertía a M1.

Teniendo en cuenta estas dos condiciones, tanto el estado oxidativo como la polarización de los Mos a M2, se co-cultivaron con las CSCs (Fig. 22D), obteniendo un mayor porcentaje de fusión en los Mos que cumplían ambas condiciones. Debido a la relación entre los Mos M2 y el microambiente tumoral, pasamos a validar este evento con las quimiocinas IL-4 (M2) con respecto a IFN- γ (M1). Inicialmente comprobamos el estado de oxidación/reducción de los Mos tras los tratamientos (Fig. 22E), observándose un mayor índice de oxidación en los Mos polarizados a M2. Al enfrentarlos a CSCs, se correlacionó la polarización M2 de los Mos con un aumento en el porcentaje de células fusionadas (Fig. 22F).

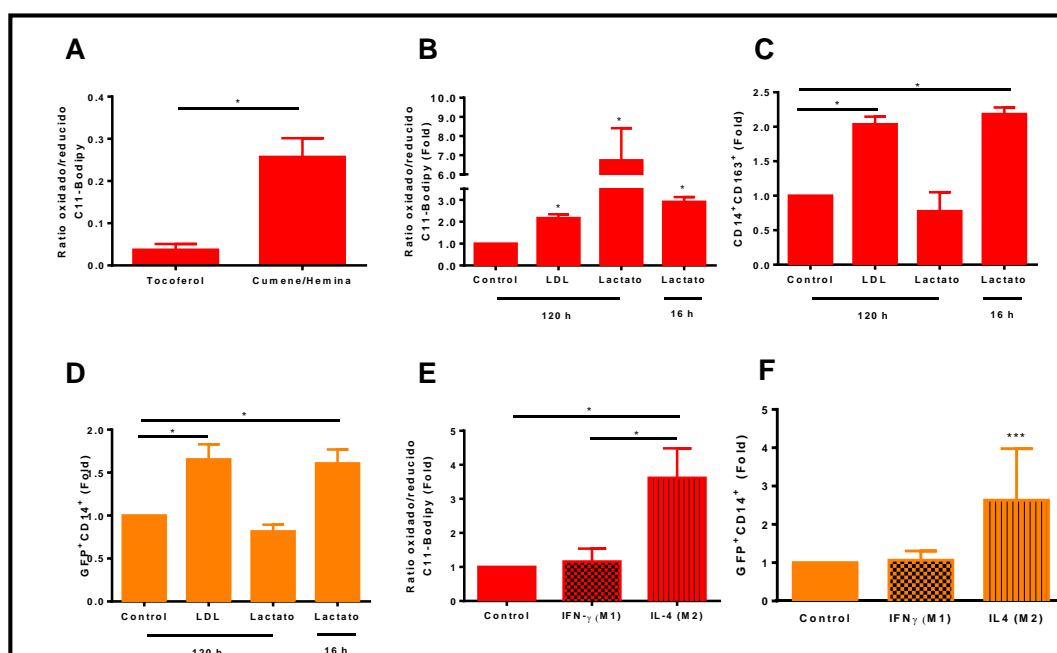


Figura 22. Implicación de la polarización de los Mos en la fusión con H460-CSC. (A) Ratio oxidado/reducido en Mos con oxidantes y reductores químicos (n=3). (B) Estado oxidado/reducido de los Mos tras el tratamiento con LDL y lactato (n= 3). (C) Población de Mos CD163⁺ tras el tratamiento con LDL y lactato (n=4). (D) Porcentaje de población híbrida CD14⁺GFP⁺ tras el tratamiento con LDL y lactato (n=4). (E) Estado oxidado/reducido de los Mos tras el tratamiento con IFN-γ e IL-4 (n=6). (F) Porcentaje de población híbrida CD14⁺GFP⁺ tras el tratamiento de polarización de los Mos (n=9). t-test Mann Whitney de una cola *, p<0,05, ***, p<0,005.

4.6 Marcadores distintivos de la fusión en pacientes de cáncer de pulmón

Al quedar establecido que los híbridos constituyen una nueva especie celular, producto de la fusión de los Mos y las CSCs, postulamos que el seguimiento de tres biomarcadores específicos podría ser suficiente para detectarlos: CD36 (porque su presencia es crucial en el mecanismo molecular de la fusión), CD14 (biomarcador de los Mos) y PANK (biomarcador de las CSCs). Al reanalizar la matriz tisular utilizada para la determinación de la presencia de CD36 / CD14 / PanK (véase 4.1.2), la marca no fue encontrada en muestras de pacientes que no desarrollaron metástasis, ni en los correspondientes controles (Fig. 23A, Tabla 7). Sin embargo, la firma fue encontrada en el 61,9% de los tumores primarios que si desarrollaron metástasis, correlacionándose entre ellos (Spearman Rho=0.602; p<0.001).

Número de Muestra	Pank/CD36/CD14	Metástasis	Número de Muestra	Pank/CD36/CD14	Metástasis
1	-	+	45	-	-
2	+	+	46	-	-
3	+	+	47	-	-
4	-	+	48	-	-
5	-	+	49	-	-
6	-	+	50	-	-
7	+	+	51	-	-
8	+	+	52	-	-
9	-	+	53	-	-
10	-	+	54	-	-
11	+	+	55	-	-
12	-	+	56	-	-
13	-	+	57	-	-
14	-	+	58	-	-
15	+	+	59	-	-
16	+	+	60	-	-
17	+	+	61	-	-
18	+	+	62	-	-
19	+	+	63	-	-
20	-	+	64	-	-
21	-	+	65	-	-
22	+	+	66	-	-
23	+	+	67	-	-
24	-	+	68	-	-
25	-	+	69	-	-
26	-	+	70	-	-
27	+	+	71	-	-
28	+	+	72	-	-
29	-	+	73	-	-
30	+	+	74	-	-
31	-	+	75	-	-
32	+	+	76	-	-
33	-	+	77	-	-
34	-	+	78	-	-
35	+	+	79	-	-
36	+	+	80	-	-
37	+	+	81	-	-
38	+	+	82	-	-
39	+	+	83	-	-
40	-	+	84	-	-
41	-	+	85	-	-
42	+	+	86	-	-
43	-	-	87	-	-
44	-	-			

Tabla 7. Clasificación de las muestras de pulmón según la co-localización de Pank/CD36/CD14 por inmunohistoquímica. Muestras 1-17 y 54-65 de carcinoma de célula escamosa (n=29), 18-35 y 66-76 de adenocarcinoma (n=29), 36-42, 80 y 81 de carcinoma de célula pequeña (n=9) 43-46 tejido control (n=4), 47-53 tejido inflamatorio (neumonía crónica) (n=7), 82 de carcinoma bronquioalveolar (n=1), 77-78 de carcinoma adenoescamoso (n=3), 83 carcinoma de célula grande (n=1) y 84-87 adenocarcinoma papilar (n=4). Spearman Rho=0.602; p<0.001, positivas +; negativas -.

Las células híbridas se encontraron en el 92,5% de las muestras de metástasis estudiadas (Fig. 23B, Fig. 25). Analizando a continuación la relación que hay entre estas muestras metastáticas y sus tumores primarios, encontramos que correlaciona la expresión de la marca PanK/CD36/CD14 entre ellos (Tabla 8, Spearman Rho=0.461; p=0.003).

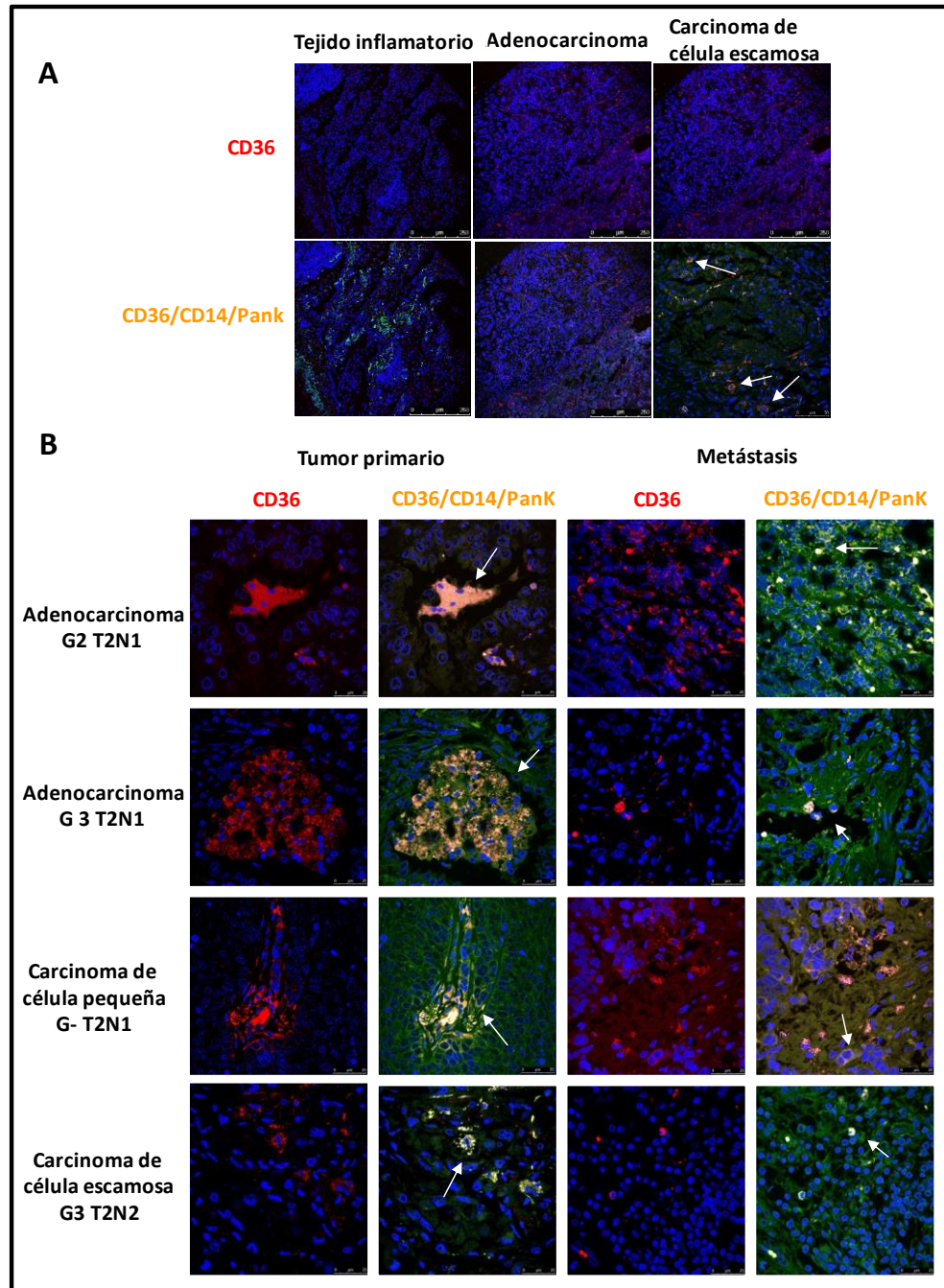
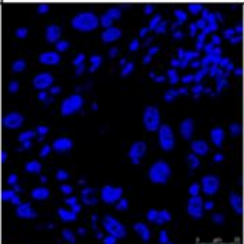
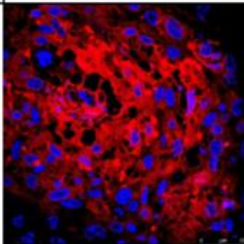
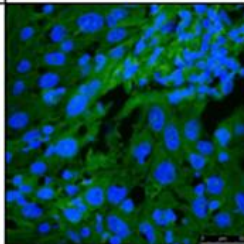
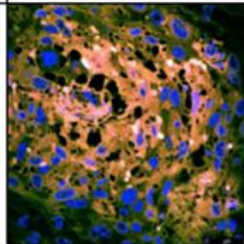
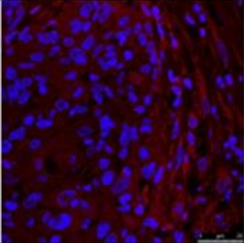
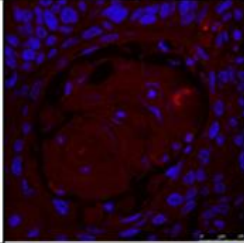
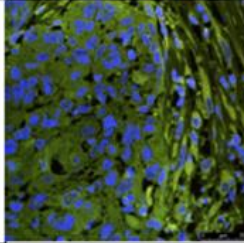
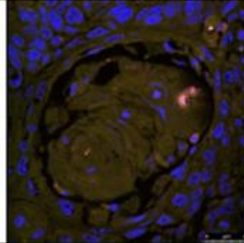
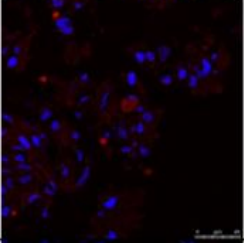
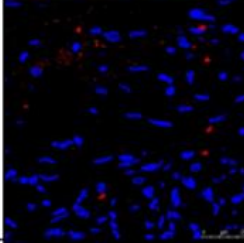
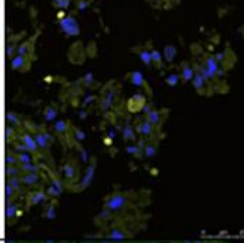
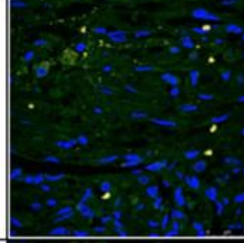
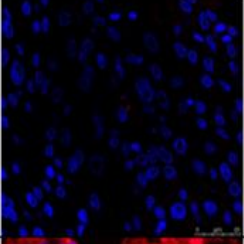
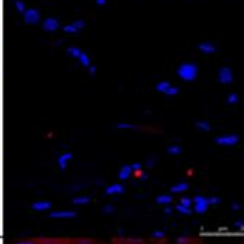
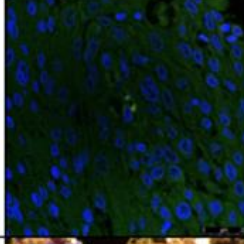
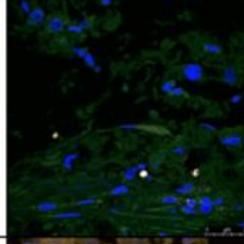
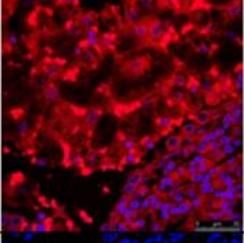
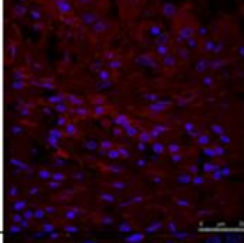
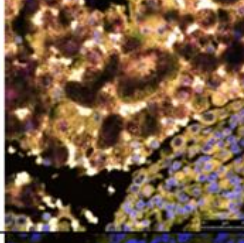
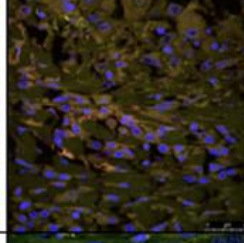
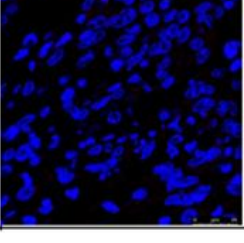
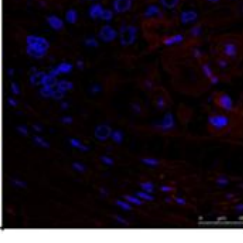
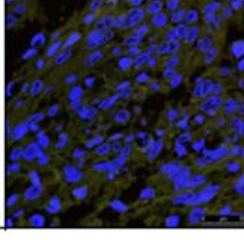
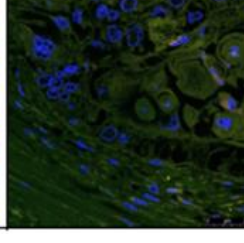
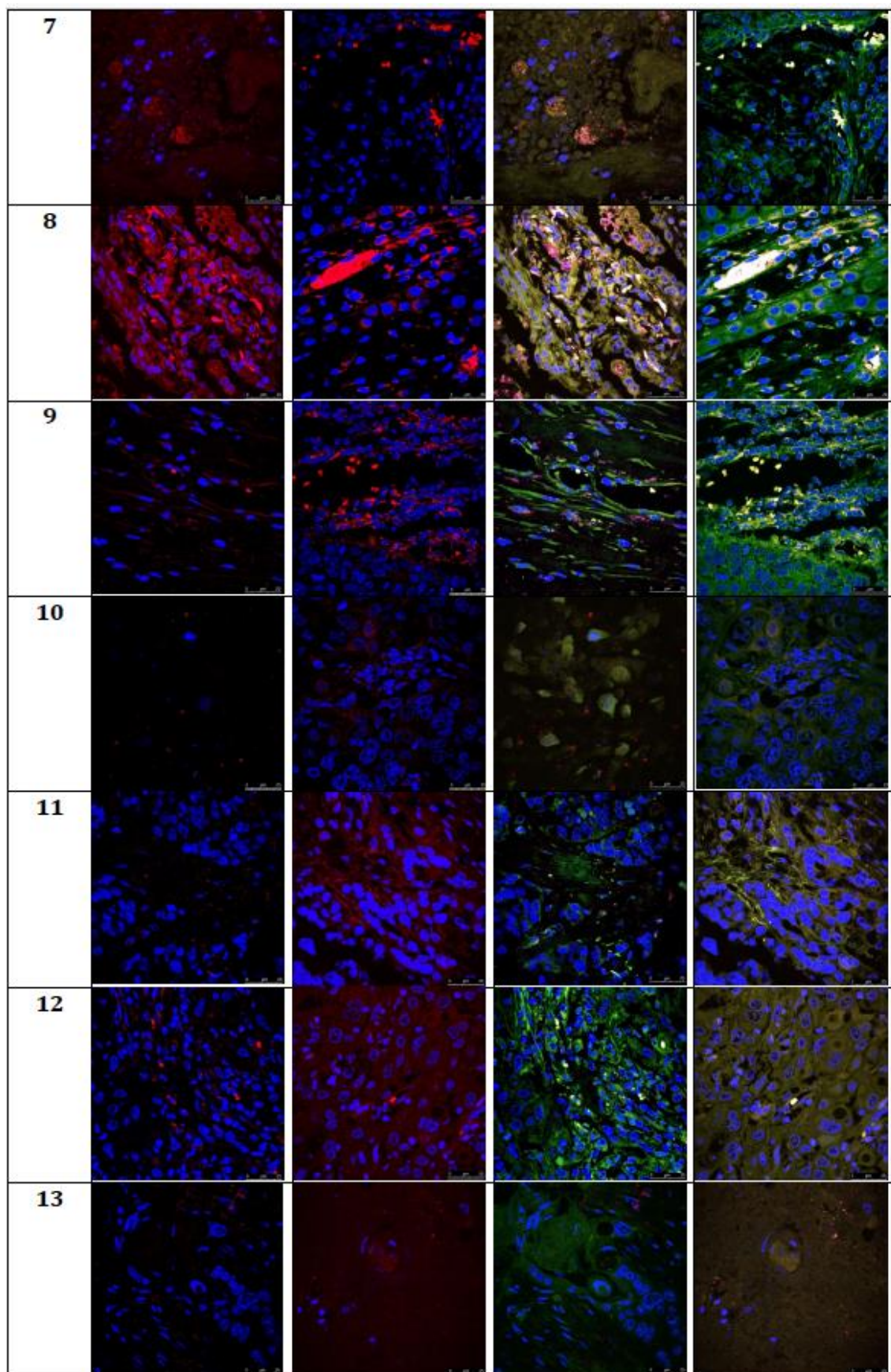
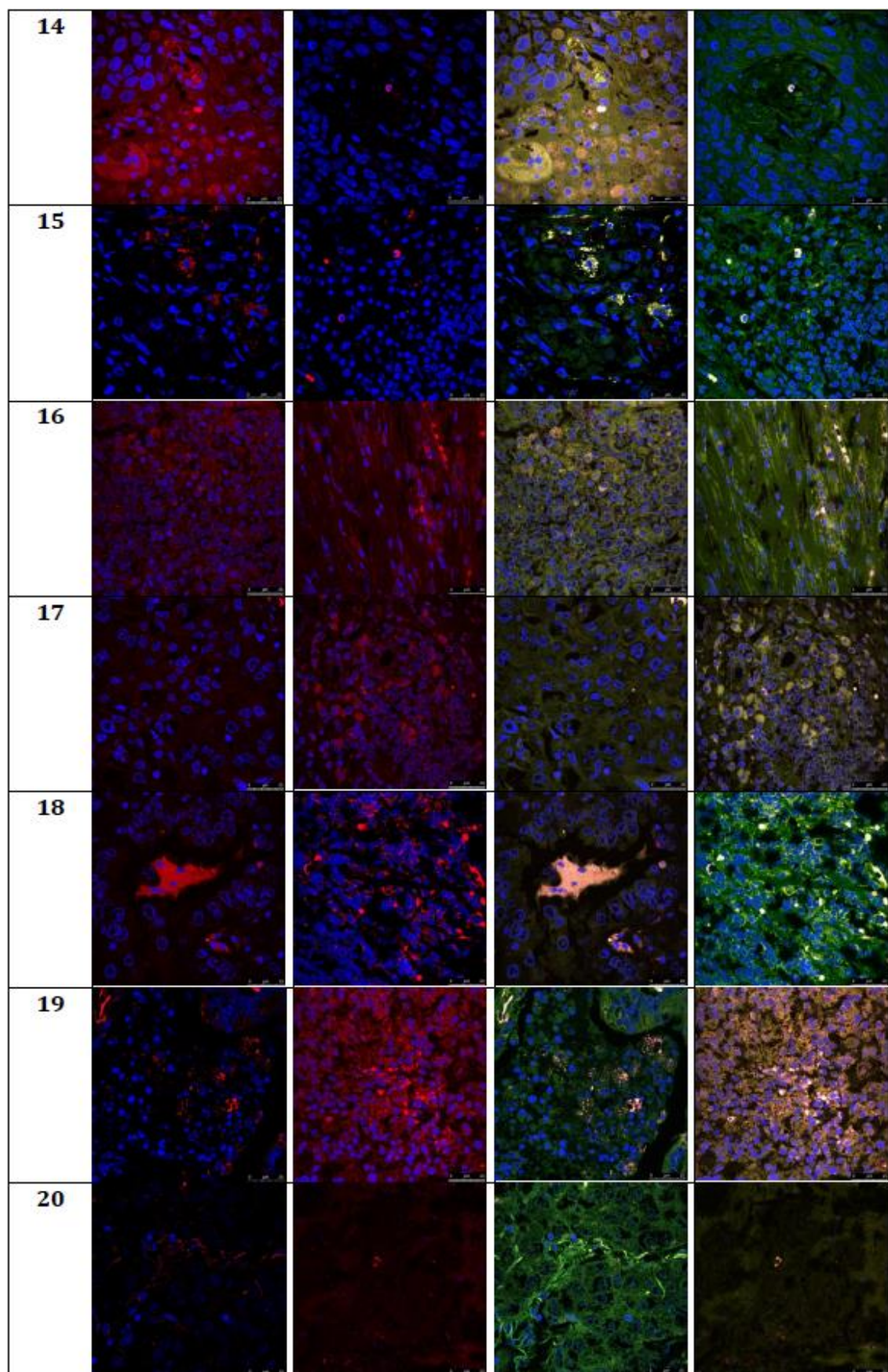
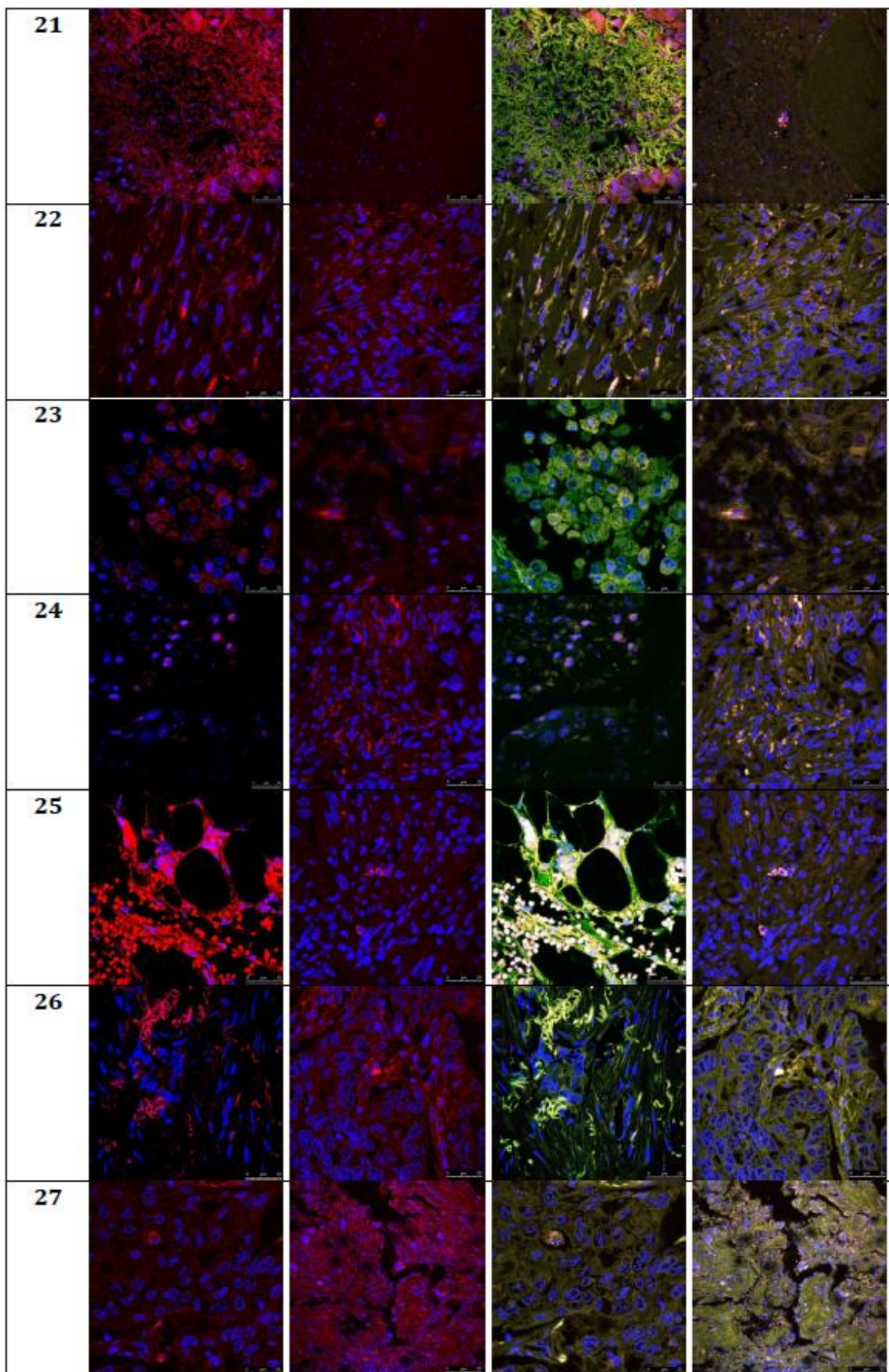


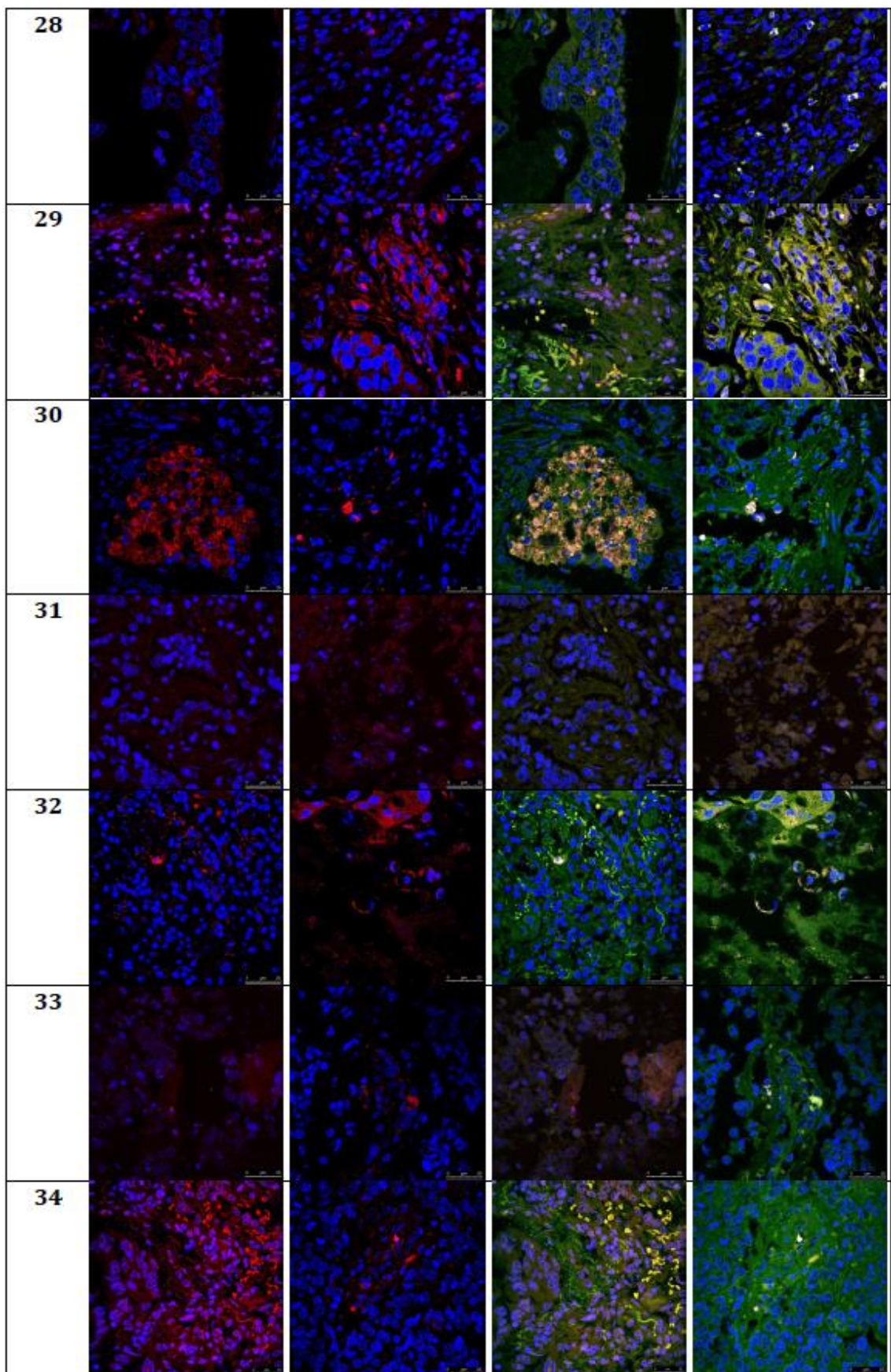
Figura 23. Marcadores específicos para el cáncer de pulmón y que definen el estadio de la metástasis. Expresión de CD36 (rojo) y PanK/CD14/CD36 (mandarina) por inmunohistoquímica en (A) tejido inflamatorio (pneumonía), adenocarcinoma y carcinoma de célula escamosa de paciente que sufrió metástasis. (Escala 0-250µm) y en (B) tumores primarios (clasificado por tipo, grado y TNM) y sus correspondientes metástasis (ver el resto de muestras en figura 25 y tabla 8, n=42). Escala 0-25µm.

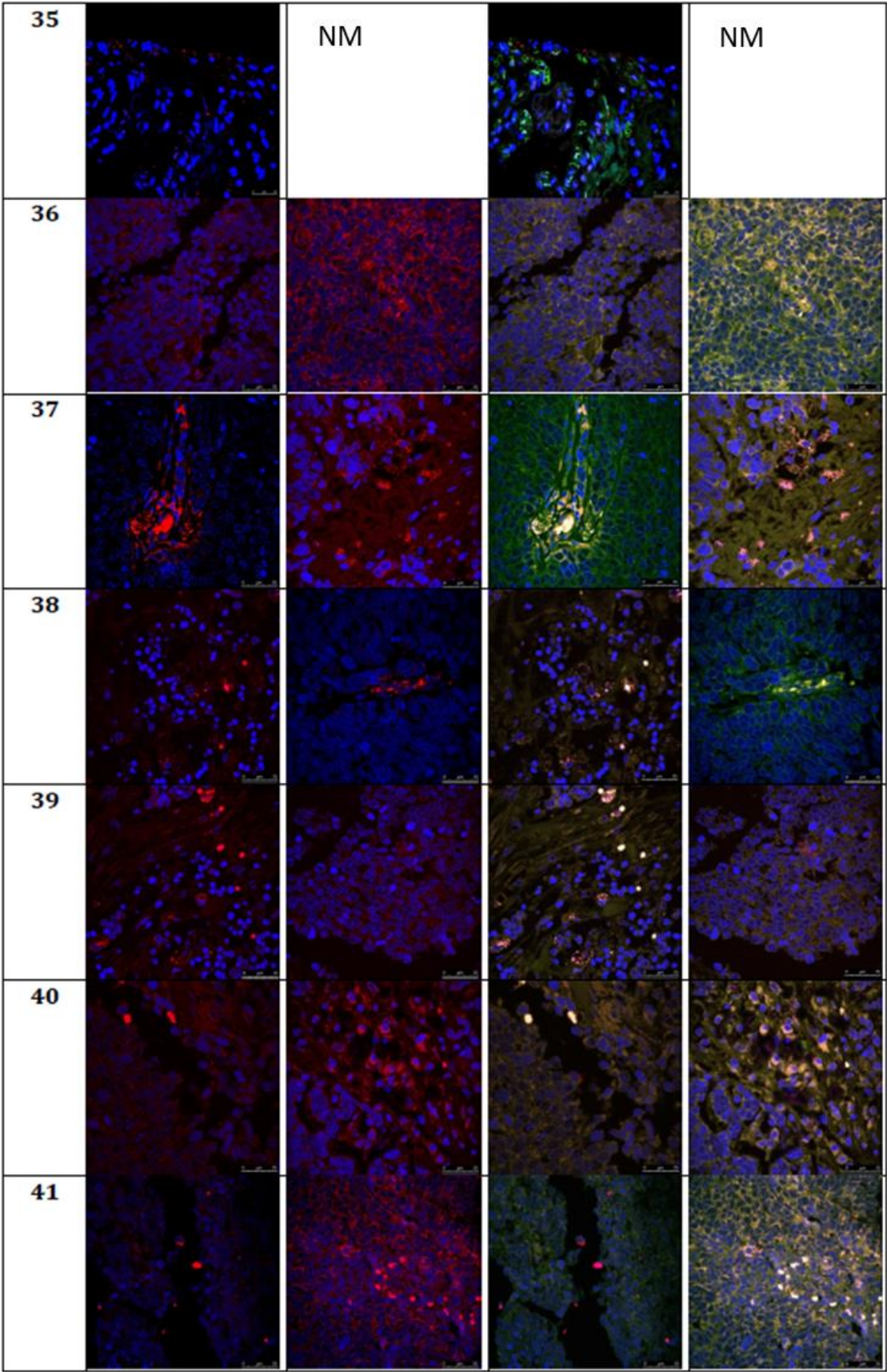
Nº	CD36		CD36/CD14/PANK	
	T	M	T	M
1				
2				
3				
4				
5				
6				











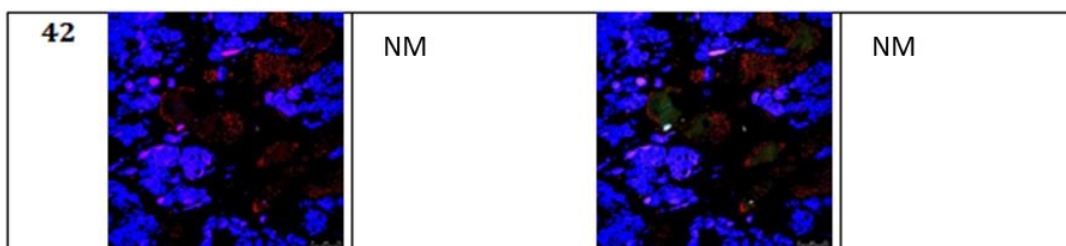


Figura 25. Imágenes de tejido tumoral y sus metástasis correspondientes. Expresión de de CD36 (rojo) y PanK/CD14/CD36 (mandarina) por inmunohistoquímica en tumores primarios (T) y sus correspondientes metástasis (M) (versión extendida). (NM) No muestra. Muestras 1-17 carcinoma de célula escamosa (n=17), 18-35 adenocarcinoma (n=18) y 36-42 carcinoma de célula pequeña (n=7). (Escala 0-25µm)

Nº de muestra	CD36/CD14/PANK	
	T	M
1	-	-
2	+	+
3	+	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	+	+
8	+	+
9	-	+
10	-	-
11	+	+
12	-	+
13	-	-
14	-	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	-	-
21	-	-
22	+	+
23	+	+
24	-	-
25	-	+
26	-	+
27	+	+
28	+	+
29	-	+
30	+	+
31	-	-
32	+	+
33	-	+
34	-	+
35	+	NM
36	+	+
37	+	+
38	+	+
39	+	+
40	-	+
41	-	+
42	+	NM

Tabla 8. Valoración de muestras humanas pareadas de pulmón y sus metástasis. T, tumor primario; MT, metástasis; NM, no muestra. Valoración hecha por inmunohistoquímica. Muestras 1-17 carcinoma de célula escamosa (n=17), 18-35 adenocarcinoma (n=18) y 36-42 carcinoma de célula pequeña (n=7) (T frente a M, Spearman Rho=0.461; p=0.003). (positivas +; negativas -)

DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1 Propiedades de los tipos celulares presentes en el nicho tumoral.

5.1.1 CD36 como marcador de mal pronóstico en cáncer.

Para explicar la metástasis en términos de la teoría de fusión celular sería necesario encontrar al menos dos tipos celulares, de todos los que componen el nicho tumoral, con propiedades que les hicieran potencialmente capaces de 1) fusionarse y 2) generar una nueva entidad celular que estuviera asociada a los estadios metastáticos de los pacientes con cáncer de pulmón. En este sentido, resulta notable el hallazgo de elevados niveles del receptor CD36, tanto *in silico* como en muestras de tejidos de estos pacientes, tal como había sido reportado en tumores primarios de carcinoma oral ¹⁹⁰ y en metástasis hepática ²¹⁷.

En primer lugar, teniendo en cuenta que la expresión de CD36 puede ser regulada positivamente por Wnt vía PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*; factor de transcripción activado por ligando) y TCF4 (*T-cell factor 4*) ²¹⁸, y a su vez la señalización por Wnt se ha visto relacionada con las vías de fusión celular ²¹⁹, se puede inferir una relación entre CD36 y la fusión celular en la metástasis. Esta idea cobra fuerza ya que CD36 está descrito como fusógeno en la formación de las células gigantes ¹⁸⁰ en *Mos*, y estos participan en fusiones fisiológicas tanto homocelulares ¹⁴⁶ como heterocelulares ¹⁶⁸.

Por otro lado, en la gran heterogeneidad celular del microambiente tumoral se encuentra una alta representación no sólo de las células del sistema inmune sino también de células tumorales y del estroma ²²⁰. Nuestros resultados con la línea tumoral H460 indican que CD36 también se expresa a niveles elevados en las CSCs, con respecto a las células tumorales no-CSCs. Estos datos son de extremo interés ya que apuntarían a las CSCs presentes en el nicho tumoral, como el otro tipo celular participante en la fusión. Además, de los diferentes subtipos de células tumorales, las CSCs serían las mejores candidatas como iniciadoras de metástasis, por ser la población con más marcas distintivas del cáncer.

5.1.2 Células tumorales y células madre tumorales.

En la consecución de este trabajo ocupa un lugar destacado el desarrollo de modelos *in vitro* para la simulación de los procesos que ocurren en el nicho tumoral y la elucidación de los mecanismos subyacentes. Para ello utilizamos dos líneas tumorales comerciales, debido fundamentalmente a la dificultad obvia de contar con material tumoral para el aislamiento y expansión de células tumorales (no-CSCs) y células madre tumorales (CSCs), suficientes para el desarrollo de experimentos robustos y reproducibles.

Con estas premisas era necesario validar las propiedades de ambos tipos celulares obtenidos según nuestros protocolos. Los análisis morfológicos y de expresión de marcadores, tanto a nivel transcripcional como traduccional, revelan grandes diferencias entre las H460-CSCs y las H460, que avalan la extrapolación de resultados *in vitro* al contexto del nicho tumoral. Así, aunque en ambas se detectan patrones de expresión tumorales^{203, 204, 206}, las H460-CSCs se distinguen por la mayor expresión de factores de transcripción determinantes de la pluripotencia y de genes asociados a las marcas distintivas del cáncer: TEM, migración, invasión, angiogénesis, entre otros.

5.2 La fusión celular.

5.2.1 Evidencia experimental.

Inicialmente la fusión celular se propuso como hipótesis para poder explicar las aneuploidías y cambios cromosómicos encontrados en las células tumorales. Posteriormente fue aplicada a la interacción virus-célula²²¹, postulándose un posible mecanismo de defensa celular mediante el cual se inhibe el ciclo celular¹⁴⁹ y se disminuye el porcentaje de células infectadas (híbridas).

En este trabajo describimos un nuevo proceso de fusión celular. Nuestros resultados *in vitro* demuestran que las CSCs y los Mos pueden fusionarse generando una nueva entidad celular: híbridos. Esta fusión es espontánea e independiente de agentes catalíticos externos y no implica ningún evento de fagocitosis previo. Además, es específica tanto de la troncalidad de las células tumorales (CSCs) como del tipo celular mieloide (Mos).

Es importante destacar que este evento de fusión tiene una frecuencia muy baja de ocurrencia (~7%), lo que le distingue del resto de fusiones fisiológicas descritas hasta el momento ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ y le sitúa en un rango plausible para el desencadenamiento de un proceso tan preciso como la metástasis. Esto podría estar apuntando bien a una baja afinidad entre las células progenitoras o a una competencia celular en el nicho tumoral en el que estos híbridos resultarían desfavorecidos. En cualquier caso, tanto la estocasticidad como cualquier proceso selectivo natural han quedado fuera del alcance teórico de esta tesis.

5.2.2 Propiedades de los híbridos generados en la fusión celular.

Tanto los análisis morfológicos como de expresión de marcadores (a niveles transcripcional y traduccional) encontrados al comparar los híbridos con sus parentales, apuntan a una identidad celular nueva. Sin embargo, las mayores evidencias resultan del análisis de cariotipos y la secuenciación masiva de especies de RNA (RNA-seq).

En nuestro modelo *in vitro* encontramos que, tras la fusión, la célula resultante es viable y tiene características que la distingue de las dos células parentales. Al analizar el cariotipo se observa, en primer lugar, una clara diferencia entre los Mos e híbridos, lo cual confirma la ausencia de cualquier evento de fagocitosis en la génesis de estos últimos. Por otra parte, las CSCs exhiben un cariotipo aberrante con diferentes variaciones cromosómicas, que se transmite a los híbridos. Este podría deberse al acortamiento telomérico, que se ha descrito que aumenta la formación de cromosomas aberrantes y fusionados, permitiendo la progresión tumoral en los estadios tempranos y confiriendo a las células un potencial ilimitado de división celular ^{73, 74}. Las aneuploidías encontradas tanto en CSCs como en híbridos, podrían relacionarse con la inestabilidad genómica y la mutagénesis ^{222, 223}. Todos estos resultados avalan, por un lado, la mezcla cromosómica entre CSCs y Mos que se observan en los híbridos y por otro, un cariotipo único y diferente para estos últimos. Este hecho constituye una prueba genética inequívoca de que los híbridos constituyen una nueva entidad celular, única dentro del nicho tumoral.

Por su parte, el análisis de RNA-seq resulta taxativo en la discriminación de la carga genética heredada por los híbridos y en su confirmación como nueva entidad celular perfectamente diferenciable de sus progenitores. Los patrones de expresión génica de los híbridos, les sitúan en una posición estadísticamente intermedia entre el

patrón inmunológico de los Mos y el tumoral de las CSCs. Es decir, genéticamente, los híbridos expresan ambos patrones a niveles iguales o mayores que los de sus respectivos parentales, lo que constituye una fuerte evidencia de la ganancia en cualidades metastáticas según nuestro modelo de fusión celular. Además, estos híbridos están enriquecidos en genes de procesos tanto inmunológicos como en vías de señalización oncológicas, con respecto a los demás tipos celulares.

La célula tumoral tiene que completar todas las marcas distintivas del cáncer, e incluso incrementarlas, para poder iniciar el proceso de metástasis. Las CSCs están descritas como un subtipo celular con elevada capacidad iniciadora de tumores, quimio-resistencia, división celular y evasión del sistema inmune ²⁷⁻³¹. Además, destacan en cultivo frente a todas las demás poblaciones tumorales por su pérdida de adherencia y resistencia a la anoikis, lo que se relaciona con la progresión del cáncer ^{28, 224}.

Siguiendo estos criterios, el análisis de las marcas distintivas del cáncer, que aparecen nuevas o aumentadas en los híbridos, resulta también revelador. La proliferación celular guarda una estrecha relación con las marcas distintivas del cáncer²²⁵, siempre que exista un mantenimiento de las señales de proliferación y una disminución de las supresoras del crecimiento. Nuestros resultados indican que, aunque las dos poblaciones tumorales son capaces de crecer y formar tumores, la población híbrida es capaz de renovarse y expandirse en una mayor extensión. Asimismo, mientras que ambas poblaciones expresan altos niveles de marcadores relacionados con la invasión y la metástasis en comparación con la población de Mos, tales como *KLF4* ⁴⁰, E-cadherina ²²⁶, Vimentina ³⁴, *KRT8*²²⁷, *KRT18*²²⁷, *CD9*²²⁸, *ITGAV*^{229, 230}, *STC1*²³¹, y *SOX2* ³⁹, los híbridos comienzan a expresar otros, tales como *EPCAM*²³², *HLA-B*²³³, *HLA-E*²³⁴, *STAT3* ^{235, 236} y *MMP19* ²³⁷, según se demuestra por RNA-seq. Los resultados *in vivo* con el modelo en ratones corroboraron los hallazgos anteriores. A diferencia de las CSCs, los híbridos no sólo fueron capaces de invadir los pulmones a las tres semanas de inoculación, sino que después de seis semanas habían colonizado los ganglios linfáticos.

Por otro lado, la progresión del cáncer también debe promover una evasión del sistema inmune por parte de la célula metastática. Esta capacidad evasiva se encuentra incrementada en los híbridos, con respecto a su progenitor tumoral, como demuestra el aumento en los niveles de *CD47* ²⁰⁴, la expresión de marcadores de M2 como *CD163*,

que probablemente les confiera una actividad protumoral a través de la inhibición del inductor de la apoptosis TWEAK²⁰⁷ y PD-L1, proteína esencial en el punto de control inmune, confiriendo a los híbridos un mecanismo de escape del sistema inmune^{208, 238, 239}, que estarían relacionados con una inhibición de los linfocitos T²⁴⁰. Funcionalmente, además, se detectan menores niveles de perforina²⁴⁰ y lisis celular²⁴¹, tras enfrentarlas *in vitro* a células NK, lo cual es indicativo de que también podrían eludir esta otra barrera inmune¹⁴⁰.

5.3 Mecanismo de la fusión.

5.3.1 Importancia de la expresión de CD36.

Como se ha mencionado al inicio de esta discusión, el hallazgo de la sobreexpresión de CD36 asociada a estadios metastáticos en cáncer de pulmón resultó clave para discernir las estirpes celulares del nicho tumoral que interactuaban en la fusión celular dando origen a las células híbridas. Por lo tanto, para comenzar el abordaje de los mecanismos implicados en la fusión, decidimos evaluar la importancia de la presencia de este marcador, tanto en CSCs como en Mos, en el rendimiento de células híbridas.

Nuestros resultados apuntan, en primer lugar, a que los receptores CD36 son determinantes en el proceso de fusión. El incremento (mediadores de vías de expresión celular) o la disminución (anticuerpos bloqueantes de superficie), aumentan y deprimen drásticamente la fusión celular. Sin embargo, tanto en los experimentos de sobreexpresión como en los de inhibición de CD36, se detectó que el aumento y disminución en la generación de híbridos eran independientes del estado de los receptores Mos. Las CSCs con altos niveles de expresión de CD36 son, por tanto, las iniciadoras del proceso de fusión.

Una explicación para este comportamiento diferencial podría estar, precisamente, en la función fagocítica de los Mos. Aunque hemos demostrado que esta fusión celular no implica fagocitosis, estos eventos están ocurriendo constantemente en el nicho celular, como se muestra mediante microscopía electrónica. De manera que, los niveles de CD36 en las CSCs podrían ser un factor atrayente para los Mos presentes en el nicho tumoral, que en un intento fallido de fagocitosis comienzan el proceso de fusión.

También podría deberse a que los Mos no necesiten de CD36 para fusionarse. Se ha descrito en la fusión homóloga entre monocitos ¹⁸², que basta con que uno de ellos exprese CD36 para que el proceso ocurra. En esta línea, sería suficiente con la expresión de CD36 en las CSCs para que la fusión se llevase a término, de manera que sólo las fluctuaciones en estos receptores influirían en el rendimiento de híbridos.

5.3.2 Papel del estado fisiológico de los Mos.

Nuestro estudio continuó con un análisis de la importancia de CD36 en el contexto funcional de los Mos. Se ha visto que CD36 interacciona con moléculas de la membrana celular tales como el ácido araquidónico ²⁴² y los ácidos grasos de cadena larga ²⁴³, siendo un sensor de lípidos y moléculas afines ²⁴⁴, relacionado directamente con las lipoproteínas más oxidadas como son las LDL ²⁴⁵ y la captación de colesterol al medio intracelular ²⁴⁶, con la consiguiente formación de las células espumosas en la arterioesclerosis ²⁴⁷. Además, en un mecanismo de retroalimentación, estas LDL constituyen uno de los ligandos de PPAR γ ²⁴⁸, ya descrito anteriormente como activador de la expresión de CD36. Todo lo cual avala la relación de LDL con la patogenia del cáncer ²⁴⁹.

Por otro lado, se ha descrito que en el microambiente tumoral los Mos (**TAMs**, *tumour associated macrophages*) se encuentran en un estado metabólico similar al fenotipo M2 ²⁵⁰ observado durante la polarización de los mismos ²⁵¹, en concordancia con el aumento de la expresión de IL-10 encontrado en las CSCs ²⁵². En este sentido se ha visto que el lactato, como producto final de la glucólisis tanto aeróbica como anaeróbica, es secretado por las células tumorales y cambia el fenotipo de los Mos a M2, induciendo la angiogénesis con *VEGF* vía *HIF-1 α* , y propiciando la expansión de las tumorales. A su vez, activa *ARG1*, una de las principales enzimas del ciclo de la urea, con el consiguiente incremento de poliaminas y fuentes de N₂ al medio, enriqueciéndolo así de combustible para las propias células tumorales ²⁵³.

Estos datos nos llevaron a evaluar el papel de los Mos en la fusión, basándonos en las relaciones que pudieran establecerse entre el flujo de metabolitos lipídicos (como las LDL) a través de CD36, los estados oxidativos provocados por éstos y las fluctuaciones en sus características metabólico-fisiológicas, que conllevasen cambios en su polaridad (p.e, inducidos por el lactato). Los resultados muestran que los mayores niveles de fusión y, por tanto, de rendimiento de híbridos, se obtienen cuando los Mos

se encuentran en un estado relativamente oxidado respecto a las condiciones basales de cultivo. El mismo puede ser alcanzado tanto por la oxidación de membrana provocada por las LDL como por los cambios en el microambiente tumoral inducidos por el lactato. Sin embargo, esta condición no es suficiente para el desarrollo de la fusión. Dependiendo de la polaridad inducida por el lactato, sólo los Mos con fenotipo M2 son capaces de fusionar de manera eficaz con las CSCs.

De manera que, partiendo de la importancia del estado oxidativo de la célula en la evolución del cáncer ²⁵⁴ y de que el mismo puede conllevar la oxidación de los ácidos grasos celulares ²⁵⁵, el mecanismo de fusión celular en la metástasis puede explicarse a través de una fuerte interacción entre el receptor CD36 procedente de las CSCs y las membranas oxidadas de los monocitos. Por su parte, la polarización a M2 podría estar propiciando tanto un fenotipo menos citotóxico a las CSCs, como (en conjunción con el estado oxidado) la expresión de ligandos específicos de CD36, que aumentarían la afinidad con las CSCs en el proceso de fusión (Fig. 24). No debe descartarse tampoco la existencia de una competencia por sustrato (p.e. las LDL oxidadas) que propicie el acercamiento entre los dos tipos celulares y la fusión por proximidad, al estar los Mos en un fenotipo M2 con carencias de respuesta citotóxica.

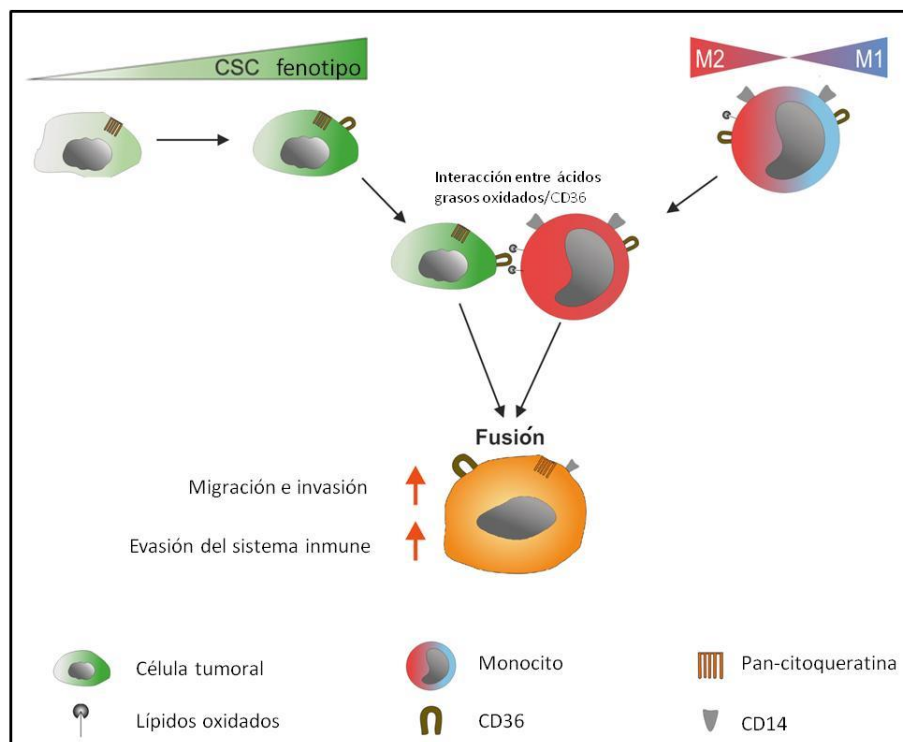


Figura 26. Esquema del proceso de fusión celular.

5.4 Marcadores de células fusionadas encontradas en pacientes y relacionadas con la progresión metastática.

Como se definió al inicio de esta discusión, uno de los hitos más importantes de este trabajo consistía en demostrar que los híbridos generados tras la fusión experimental de CSCs y Mos, de existir, serían encontrados también en pacientes de cáncer de pulmón, asociados a sus metástasis. Nuestros resultados avalan esta premisa.

La triada de marcadores CD36⁺CD14⁺PANK⁺, que define a los híbridos en condiciones *in vivo*, no sólo fue encontrada exclusivamente en pacientes con cáncer de pulmón (en comparación con otras enfermedades no oncológicas) sino que además es específica de aquéllos que desarrollan estadios metastáticos. El hecho de encontrar las mismas células híbridas en los tumores primarios y sus respectivas metástasis, además de las características encontradas *in vitro* de estas y encontrarlas en circulación solo en pacientes con metástasis, nos indica que estas células son las responsables de migrar desde el tumor primario al órgano diana de la metástasis.

Este estudio demuestra que las células CD36⁺CD14⁺PANK⁺ actúan como un “Caballo de Troya” en el desarrollo de la enfermedad tumoral, promoviendo la evasión del sistema inmune y permitiendo la colonización por estas células de órganos distales.

Además, habiendo elucidado en este trabajo el mecanismo por el cual se generan las células híbridas CSCs-Mos, futuros estudios farmacológicos de inhibición de la fusión heterocelular podrían utilizarse como terapia eficaz frente a la progresión de la enfermedad hacia sus últimos estadios.

Estos descubrimientos refuerzan el concepto de la extrema complejidad del proceso de la metástasis, y abren una nueva ventana de investigaciones, básicas y clínicas, en el tratamiento del cáncer pulmonar y la metástasis.

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

1. La expresión elevada del receptor CD36 en el cáncer de pulmón constituye un marcador de mal pronóstico, asociado al desarrollo de metástasis.

2. Las células tumorales troncales (CSCs) y los Mos, pueden fusionarse espontáneamente *in vitro* para generar un nuevo ente celular híbrido, con la firma de biomarcadores CD36⁺CD14⁺PANK⁺. Esta población representa un 7% del cultivo celular viable y exhibe características genéticas, morfológicas y funcionales que difieren de ambas poblaciones parentales de origen.

3. Esta población híbrida completa las marcas distintivas del cáncer de una manera más eficiente que las CSCs, mostrando mayores índices de proliferación, invasión y evasión del sistema inmune, tanto *in vitro* como en modelos de ratón.

4. El mecanismo de la fusión celular está determinado tanto por la expresión de CD36 en las CSC como por la polarización y el estado oxidativo de los Mos. La fusión entre ambas especies celulares será más eficiente mientras mayores sean la expresión de CD36 por las CSCs y la oxidación de Mos con fenotipo M2.

5. El microambiente tumoral juega un papel fundamental en el alcance de la fusión celular, al aportar metabolitos que hagan fluctuar tanto las propiedades de las células progenitoras, como las condiciones para la interacción y el desarrollo de las marcas distintivas de los híbridos.

6. Hemos validado esta hipótesis de fusión celular, al demostrar la presencia de los híbridos CD36⁺CD14⁺PANK⁺ tanto en la circulación de pacientes de cáncer de pulmón, como en los tumores primarios y sus metástasis (muestras pareadas).

7. Estos hallazgos constituyen en sí mismos, la piedra fundacional de un nuevo paradigma de la metástasis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referencias bibliográficas

1. NIH. www.cancer.gov. 2015. (actualizado 9 Febrero 2015; acceso 15 Octubre 2017). Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;**136**: 359-386.
3. GBD Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;**388**:1659-1724.
4. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health* 2016;**4**:609-616.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, acceso 15 Octubre 2017.
6. WHO. www.who.int. 2017. (Acceso 20 Julio 2017) Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297 2017.
7. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;**49**:1374-1403.
8. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA: Cancer J Clin* 2001;**51**:15-36.
9. Hecht S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;**91**:16.
10. Adler I. Primary malignant growths of the lungs and bronchi; a pathological and clinical study. New York: Longmans, Green, 1912.
11. Pearl R. TOBACCO SMOKING AND LONGEVITY. *Science* 1938;**87**:216-217.
12. Doll R, Hill AB. Smoking and Carcinoma of the Lung. *Br Med J* 1950;**2**:739-748.
13. Vincent T. DeVita J, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Cancer: Principles & Practice of Oncology. Philadelphia, PA 19106 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2005.
14. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol* 2015;**10**:1243-1260.
15. Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol* 2012;**25**:S18-S30.
16. Cornejo KM, Shi M, Akalin A, Uy K, Cagle PT, Fraire AE. Pulmonary Papillary Adenoma: A Case Report and Review of the Literature. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2013;**20**:52-57.
17. WHO. International Classification of Diseases for Oncology. WHO Library Cataloguing, 1976.
18. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *CHEST*; **151**:193-203.
19. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008;**83**:584-594.
20. ATCC. www.lgcstandards-atcc.org. 2016. (Actualizado 2016; acceso 15 Octubre 2017). Disponible en: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-177.aspx?geo_country=es#characteristics.

21. ATCC. www.lgcstandards-atcc.org. 2016. (Actualizado 2016; acceso 15 Octubre 2017). Disponible en: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185?geo_country=es.
22. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;**1**:157-162.
23. Hethcote HW, Knudson AG. Model for the incidence of embryonal cancers: application to retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1978;**75**:2453-2457.
24. Armitage P. Multistage models of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1985;**63**:195-201.
25. Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med* 2008;**12**:374-390.
26. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;**414**:105-111.
27. Frisch SM, Schaller M, Cieply B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci* 2013;**126**:21-29.
28. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1833**:3481-3498.
29. Lopez-Ayllon BD, Moncho-Amor V, Abarrategi A, de Cáceres II, Castro-Carpeño J, Belda-Iniesta C et al. Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations. *Cancer Med* 2014;**3**:1099-1111.
30. Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 2012;**7**:597-615.
31. Neuzil J, Stantic M, Zabalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L et al. Tumour-initiating cells vs. cancer ‘stem’ cells and CD133: What’s in the name? *Biochem Biophys Res Comm* 2007;**355**:855-859.
32. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R et al. SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2016;**6**:30489.
33. Zhao D, Pan C, Sun J, Gilbert C, Drews-Elger K, Azzam DJ et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene* 2015;**34**:3107-3119.
34. Mitra A, Satelli A, Xia X, Cutrera J, Lopa M, Li S. Cell-surface Vimentin (csVim): A mislocalized protein for isolating csVimentin(+)CD133(–) novel stem-like hepatocellular carcinoma cells expressing EMT markers. *Int J Can* 2015;**137**:491-496.
35. Liu Z, Zhang J, Kang H, Sun G, Wang B, Wang Y et al. Significance of stem cell marker Nanog gene in the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Oncol Lett* 2016;**12**:2507-2510.
36. Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, Loh Y-H, Wang B, Ng H-H, Robson P. Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005;**280**:24731-24737.
37. Chew J-L, Loh Y-H, Zhang W, Chen X, Tam W-L, Yeap L-S et al. Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:6031-6046.
38. Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Can Res* 2012;**2**:340-356.
39. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957;**1**:779-786.
40. Vaira V, Favarsani A, Martin NM, Garlick DS, Ferrero S, Nosotti M, Kissil JL, Bosari S, Altieri DC. REGULATION OF LUNG CANCER METASTASIS BY Klf4-Numb-like SIGNALING. *Cancer Res* 2013;**73**:2695-2705.
41. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;**100**:57-70.

42. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2015;**144**:646-674.
43. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;**26**:1324-1337.
44. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;**432**:307-315.
45. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 2008;**132**:27-42.
46. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007;**21**:2861-2873.
47. Zong W-X, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006;**20**:1-15.
48. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;**432**:332-337.
49. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2010;**141**:1117-1134.
50. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* 2010;**25**:85-101.
51. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol* 2006;**8**:77-82.
52. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming Growth Factor- β Signaling–Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Mol Cancer Res* 2008;**6**:1521-1533.
53. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010;**29**:5545-5555.
54. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;**27**:5497-5510.
55. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009;**102**:19-65.
56. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008;**455**:1069-1075.
57. Wertz IE, Dixit VM. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ* 2009;**17**:14-24.
58. Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:835-850.
59. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:671-682.
60. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005;**24**:2909-2915.
61. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu C-H, McClatchey AI. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* 2007;**177**:893-903.
62. Partanen JI, Nieminen AI, Klefstrom J. 3D view to tumor suppression: lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-myc. *Cell Cycle* 2009;**8**:716-724.
63. Hezel AF, Bardeesy N. LKB1; linking cell structure and tumor suppression. *Oncogene* 2008;**27**:6908-6919.
64. Ikushima H, Miyazono K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010;**10**:415-424.
65. Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell* 2008;**134**:215-230.
66. Finger EC, Turley RS, Dong M, How T, Fields TA, Blobe GC. T β RIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 2008;**29**:528-535.
67. Hanahan D, Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996;**86**:353-364.
68. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**:789-791.

69. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D et al. Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* 2009;**324**:1457-1461.
70. Zee Y-K, O'Connor JPB, Parker GJM, Jackson A, Clamp AR, Taylor MB et al. Imaging angiogenesis of genitourinary tumors. *Nat Rev Urol* 2010;**7**:69-82.
71. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer Res* 2005;**65**:3967-3979.
72. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:611-622.
73. Kawai T, Hiroi S, Nakanishi K, Meeker AK. Telomere Length and Telomerase Expression in Atypical Adenomatous Hyperplasia and Small Bronchioloalveolar Carcinoma of the Lung. *Am J Clin Pathol* 2007;**127**:254-262.
74. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010;**31**:9-18.
75. Berx G, van Roy F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;**1**:a003129.
76. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**:118-132.
77. Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2013;**81**:117-122.
78. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev Cell* 2010;**19**:698-711.
79. Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annu Rev Pathol* 2010;**5**:51-75.
80. Barnes DE, Lindahl T. Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells. *Annu Rev Genet* 2004;**38**:445-476.
81. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956;**123**:309-314.
82. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 2009;**23**:537-548.
83. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab* 2008;**7**:11-20.
84. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med* 1986;**315**:1650-1659.
85. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 2010;**29**:309-316.
86. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 2010;**140**:883-899.
87. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* 2010;**141**:39-51.
88. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 2009;**125**:1747-1754.
89. Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* 2008;**84**:988-993.
90. Kitamura T, Qian B-Z, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 2015;**15**:73-86.
91. Récamier JCA. Recherches sur le traitement du cancer sur la compression methodique simple ou combinee et sur l'histoire generale de la meme maladie. 2nd ed., 1829.
92. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;**1**:3.

93. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;**19**:1423-1437.
94. Fidler IJ. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival *in Vivo*. *Cancer Res* 1975;**35**:218-224.
95. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;**45**:773-782.
96. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015;**527**:329-335.
97. Van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972;**46**:845-852.
98. Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol* 2008;**9**:695-698.
99. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* 2009;**325**:612-616.
100. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009;**50**:261-274.
101. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;**158**:670-689.
102. López-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care* 2013;**17**:242-242.
103. del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Jurado T, Kajiji T, Shu C, Marín E, Gutierrez del Arroyo A, Prados C, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Biswas SK, López-Collazo E. Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis Patients. *J Immunol* 2009;**182**:6494-6507.
104. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009;**30**:475-487.
105. Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen Chlamydia pneumoniae. *PLoS One* 2015;**10**:e0143593.
106. del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, González-León MC, Gómez-García L, Mendoza-Barberá E, Rodríguez-Rojas A, García F, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 2007;**13**:39-52.
107. López-Collazo E, Fuentes-Prior P, Arnalich F, del Fresno C. Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-M: implications in refractory state. *Curr Opin Infect Dis* 2006;**19**:237-244.
108. Shalova Irina N, Lim Jyue Y, Chittechath M, Zinkernagel Annelies S, Beasley F, Hernández-Jiménez E, Toledano V, Cubillos-Zapata C, Rapisarda A, Chen J, Duan K, Yang H, Poidinger M, Melillo G, Nizet V, Arnalich F, López-Collazo E, Biswas Subhra K. Human Monocytes Undergo Functional Re-programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1α. *Immunity* 2015;**42**:484-498.
109. López-Collazo E, Gómez-Piña V, Arnalich F. Understanding immune dysfunctions in sepsis patients. *Crit Care* 2010;**14**:435-435.
110. del Fresno C, Otero K, Gómez-García L, González-León MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, Escoll P, Baos R, Caveda L, García F, Arnalich F, López-Collazo E. Tumor Cells

- Deactivate Human Monocytes by Up-Regulating IL-1 Receptor Associated Kinase-M Expression via CD44 and TLR4. *J Immunol* 2005;**174**:3032-3040.
111. Mytar B, Woloszyn M, Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Ruggiero I et al. Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J leukoc biol* 2003;**74**:1094-1101.
 112. Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2007;**17**:275-287.
 113. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014;**513**:559-563.
 114. Hernández-Jiménez E, Cubillos-Zapata C, Toledano V, Pérez de Diego R, Fernández-Navarro I, Casitas R, Carpio C, Casas-Martín J, Valentín J, Varela-Serrano A, Avendaño-Ortiz J, Alvarez E, Aguirre Luis A, Pérez-Martínez A, De Miguel MP, Belda-Iniesta C, García-Río F, López-Collazo E. Monocytes inhibit NK activity via TGF- β in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2017;**49**.
 115. Cooper MD, Peterson RDA, South MA, Good RA. THE FUNCTIONS OF THE THYMUS SYSTEM AND THE BURSA SYSTEM IN THE CHICKEN. *J Exp Med* 1966;**123**:75-102.
 116. Good RA, Zak SJ. DISTURBANCES IN GAMMA GLOBULIN SYNTHESIS AS "EXPERIMENTS OF NATURE". *Pediatrics* 1956;**18**:109-149.
 117. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;**112**:1570-1580.
 118. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:24-35.
 119. Jiang X, Chen Y, Peng H, Tian Z. Single line or parallel lines: NK cell differentiation driven by T-bet and Eomes. *Cell Mol Immunol* 2012;**9**:193-194.
 120. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 2006;**24**:257-286.
 121. Hughes T, Briercheck EL, Freud AG, Trotta R, McClory S, Scoville SD et al. The transcription Factor AHR prevents the differentiation of a stage 3 innate lymphoid cell subset to natural killer cells. *Cell Rep* 2014;**8**:150-162.
 122. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006;**214**:56-72.
 123. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J exp Med* 2006;**203**:1033-1043.
 124. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 2012;**36**:55-67.
 125. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 2007;**220**:169-182.
 126. Ferlazzo G, Munz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 2004;**172**:1333-1339.
 127. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends immunol* 2001;**22**:633-640.
 128. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetenck S, Stewart CA et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006;**25**:331-342.
 129. Ehrlich P. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909;**5**:273-290.
 130. Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2007;**220**:82-101.

131. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2009;**29**:1093-1102.
132. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003;**195**:346-355.
133. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ et al. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;**410**:1107-1111.
134. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL et al. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;**87**:1486-1490.
135. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;**3**:991-998.
136. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 2004;**21**:137-148.
137. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006;**90**:1-50.
138. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**:941-952.
139. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:705-713.
140. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003;**90**:127-156.
141. do Nascimento ES, Sampaio LM, Peixoto-Souza FS, Dias FD, Gomes EL, Greffo FR et al. Home-based pulmonary rehabilitation improves clinical features and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int J Chron Obstruc Pulm Dis* 2015;**10**:645-653.
142. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007;**8**:341-352.
143. Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 2004;**40**:1660-1667.
144. Dirx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:1183-1196.
145. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol* 2008;**84**:623-630.
146. Helming L, Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 2008;**212**:785-793.
147. Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies MK. Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Dev Biol* 2010;**341**:66-83.
148. Benirschke K. Remarkable placenta. *Clin Anat* 1998;**11**:194-205.
149. Duelli D, Lazebnik Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:968-976.
150. Chernomordik LV, Zimmerberg J, Kozlov MM. Membranes of the world unite! *J Cell Biol* 2006;**175**:201-207.
151. Hindi SM, Tajrishi MM, Kumar A. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. *Sci Signal* 2013;**6**:re2.
152. Larsson L-I, Bjerregaard B, Talts JF. Cell fusions in mammals. *Histochem Cell Biol* 2008;**129**:551-561.

153. Wojcieszyn JW, Schlegel RA, Lumley-Sapanski K, Jacobson KA. Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J Cell Biol* 1983;**96**:151-159.
154. Aichel O iRW. Über Zellverschmelzung mit qualitativ abnormer Chromosomenverteilung als Ursache der Geschwulstbildung Leipzig, Germany: Wilhelm Engelmann, 1911.
155. Mekler L. A general theory of oncogenesis (Ruso). Materials of symposia on general immunol. *The club of immunologists of NF Gamaleya Inst of Epidemiol and Microbiol* 1968;**3**:91–100.
156. Mekler L. Hybridization of transformed cells with lymphocytes as 1 of the probable causes of the progression leading to the development of metastatic malignant cells. *Vestn Acad Med Nauk SSR* 1971;**26**:80-89.
157. Goldenberg D. On the progression of malignity: a hypothesis. *Klin Wochenschr* 1968;**46**:898-899.
158. DM Goldenberg HG. On the 'human' nature of highly malignant heterotransplantable tumors of human origin. *Eur J Cancer* 1968;**4**:547-548.
159. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *J Exp Med* 2001;**193**:727-740.
160. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* 1999;**66**:889-900.
161. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009;**324**:1029-1033.
162. Roiniotis J, Dinh H, Masendycz P, Turner A, Elsegood C, M Scholz G et al. Hypoxia Prolongs Monocyte/Macrophage Survival and Enhanced Glycolysis Is Associated with Their Maturation under Aerobic Conditions. *J Immunol* 2009;**182**:7974-7981.
163. Chakraborty A, Lazova R, Davies S, Backvall H, Ponten F, Brash D et al. Donor DNA in a renal cell carcinoma metastasis from a bone marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant* 2004;**34**:183-186.
164. Yilmaz Y, Lazova R, Qumsiyeh M, Cooper D, Pawelek J. Donor Y chromosome in renal carcinoma cells of a female BMT recipient: visualization of putative BMT-tumor hybrids by FISH. *Bone Marrow Transplant* 2005;**35**:1021-1024.
165. Lazova R, LaBerge GS, Duvall E, Spoelstra N, Klump V, Sznol M et al. A Melanoma Brain Metastasis with a Donor-Patient Hybrid Genome following Bone Marrow Transplantation: First Evidence for Fusion in Human Cancer. *PLoS One* 2013;**8**:e66731.
166. LaBerge GS, Duvall E, Grasmick Z, Haedicke K, Pawelek J. A Melanoma Lymph Node Metastasis with a Donor-Patient Hybrid Genome following Bone Marrow Transplantation: A Second Case of Leucocyte-Tumor Cell Hybridization in Cancer Metastasis. *PLoS One* 2017;**12**:e0168581.
167. Andersen TL, Boissy P, Sondergaard TE, Kupisiewicz K, Plesner T, Rasmussen T, Haaber J, Kølvrå S, Delaissé JM. Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: a new type of cancer–host partnership? *J Pathol* 2007;**211**:10-17.
168. Davies PS, Powell AE, Swain JR, Wong MH. Inflammation and Proliferation Act Together to Mediate Intestinal Cell Fusion. *PLoS One* 2009;**4**:e6530.
169. Powell AE, Anderson EC, Davies PS, Silk AD, Pelz C, Impey S, Wong MH. Fusion between intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming. *Cancer Res* 2011;**71**:1497-1505.
170. Silk AD, Gast CE, Davies PS, Fakhari FD, Vanderbeek GE, Mori M, Wong MH. Fusion between Hematopoietic and Epithelial Cells in Adult Human Intestine. *PLoS One* 2013;**8**:e55572.
171. Vassilopoulos G, Wang P-R, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;**422**:901-904.

172. Medvinsky A, Smith A. Stem cells: Fusion brings down barriers. *Nature* 2003;**422**:823-825.
173. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;**422**:897-901.
174. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;**416**:542-545.
175. Mi S, Lee X, Li X-p, Veldman GM, Finnerty H, Racie L et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000;**403**:785-789.
176. Dupressoir A, Vernochet C, Harper F, Guégan J, Dessen P, Pierron G et al. A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2011;**108**:E1164-E1173.
177. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F et al. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science* 2000;**287**:321-324.
178. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005;**434**:234-238.
179. Helming L, Gordon S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. *Eur J Immunol* 2007;**37**:33-42.
180. Helming L, Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol* 2009;**19**:514-522.
181. Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, del Fresno C, Rodríguez-Rojas A, García F, Glaría A, Sánchez M, Vallejo-Cremades MT, Baos R, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E. 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: a putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol* 2007;**82**:700-709.
182. Helming L, Winter J, Gordon S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J Cell Sci* 2009;**122**:453-459.
183. Furuhashi M, Ura N, Nakata T, Shimamoto K. Insulin Sensitivity and Lipid Metabolism in Human CD36 Deficiency. *Diabetes Care* 2003;**26**:471-474.
184. Alkhatatbeh MJ, Enjeti AK, Acharya S, Thorne RF, Lincz LF. The origin of circulating CD36 in type 2 diabetes. *Nutr Diabetes* 2013;**3**:e59.
185. Love-Gregory L, Abumrad NA. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. *Curr Opin Clinl Nutr Metab Care* 2011;**14**:527-534.
186. Xu S, Jay A, Brunaldi K, Huang N, Hamilton JA. CD36 Enhances Fatty Acid Uptake by Increasing the Rate of Intracellular Esterification but Not Transport across the Plasma Membrane. *Biochem* 2013;**52**:7254-7261.
187. McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 2000;**96**:3231-3240.
188. Langhans T. Ueber Riesenzellen mit wandständigen Kernen in Tuberkeln und die fibrose Form des Tuberkels. *Virchows Arch Pathol Anat* 1868:22.
189. Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* 2000:7.
190. Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS-O, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* 2017;**541**:41-45.
191. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer discov* 2012;**2**:401-404.

192. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;**6**:pl1.
193. Cubillos-Zapata C, Hernández-Jiménez E, Toledano V, Esteban-Burgos L, Fernández-Ruiz I, Gómez-Piña V, del Fresno C, Siliceo M, Prieto-Chinchíña P, Pérez de Diego R, Boscá L, Fresno M, Arnalich F, López-Collazo E. NFκB2/p100 Is a Key Factor for Endotoxin Tolerance in Human Monocytes: A Demonstration Using Primary Human Monocytes from Patients with Sepsis. *J Immunol* 2014;**193**:4195-4202.
194. Fernández-Ruiz I, Arnalich F, Cubillos-Zapata C, Hernández-Jiménez E, Moreno-González R, Toledano V, Fernández-Velasco M, Vallejo-Cremades MT, Esteban-Burgos L, de Diego RP, Llamas-Matias MA, García-Arumi E, Martí R, Boscá L, Andreu AL, López-Sendón JL, López-Collazo E. Mitochondrial DAMPs Induce Endotoxin Tolerance in Human Monocytes: An Observation in Patients with Myocardial Infarction. *PLoS One* 2014;**9**:e95073.
195. Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Rodríguez-Rojas A, del Fresno C, García F, Vallejo-Cremades MT, Fernández-Ruiz I, Arnalich F, Fuentes-Prior P, López-Collazo E. Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. *J Immunol* 2007;**179**:4065-4073.
196. Soares-Schanoski A, Jurado T, Córdoba R, Siliceo M, Fresno Cd, Gómez-Piña V, Toledano V, Vallejo-Cremades MT, Alfonso-Iñiguez S, Carballo-Palos A, Fernández-Ruiz I, Cubillas-Zapata C, Biswas SK, Arnalich F, García-Río F, López-Collazo E. Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;**423**:331-337.
197. Koido S, Ohana M, Liu C, Nikrui N, Durfee J, Lerner A et al. Dendritic cells fused with human cancer cells: morphology, antigen expression, and T cell stimulation. *Clin Immunol* 2004;**113**:261-269.
198. Pedrazzoli F, Chrysantzas I, Dezzani L, Rosti V, Vincitorio M, Sitar G. Cell fusion in tumor progression: the isolation of cell fusion products by physical methods. *Cancer Cell Int* 2011;**11**:32.
199. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010;**102**:1555-1577.
200. Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, Morgan TM, Taichman RS. Cancer Stem Cells and their Role in Metastasis. *Pharmacol Ther* 2013;**138**:285-293.
201. Hardavella G, George R, Sethi T. Lung cancer stem cells—characteristics, phenotype. *Transl Lung Cancer Res* 2016;**5**:272-279.
202. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2007;**15**:504-514.
203. Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010;**102**:789-795.
204. Fehervari Z. Don't eat me, activate me. *Nat Immunol* 2015;**16**:1113-1113.
205. Kohmo S, Kijima T, Otani Y, Mori M, Minami T, Takahashi R et al. Cell Surface Tetraspanin CD9 Mediates Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2010;**70**:8025-8035.
206. Oft M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res* 2014;**2**:194-199.
207. Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M et al. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol* 2007;**178**:8183-8194.
208. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest* 2015;**125**:3384-3391.

209. Ishii T, Mann GE. Redox status in mammalian cells and stem cells during culture in vitro: Critical roles of Nrf2 and cystine transporter activity in the maintenance of redox balance. *Redox Biol* 2014;**2**:786-794.
210. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 1998;**39**:777-788.
211. Ishii T, Mann GE. Redox status in mammalian cells and stem cells during culture in vitro: critical roles of Nrf2 and cystine transporter activity in the maintenance of redox balance. *Redox Biol* 2014;**2**:786-794.
212. Hale JS, Otvos B, Sinyuk M, Alvarado AG, Hitomi M, Stoltz K et al. Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression. *Stem Cells* 2014;**32**:1746-1758.
213. He C, Carter AB. The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization. *J Clin Cell Immunol* 2015;**6**.
214. Jofre-Monseny L, de Pascual-Teresa S, Plonka E, Huebbe P, Boesch-Saadatmandi C, Minihane A-M et al. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on markers of oxidative status in macrophages. *Br J Nutr* 2007;**97**:864-871.
215. Peluso I, Adorno G, Raguzzini A, Urban L, Ghiselli A, Serafini M. A new flow cytometry method to measure oxidative status: The Peroxidation of Leukocytes Index Ratio (PLIR). *J Immunol Methods* 2013;**390**:113-120.
216. Hu JM, Liu K, Liu JH, Jiang XL, Wang XL, Chen YZ et al. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predict aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;**8**:21526-21538.
217. Nath A, Li I, Roberts LR, Chan C. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2015;**5**:14752.
218. Wang S, Sun Z, Zhang X, Li Z, Wu M, Zhao W et al. Wnt1 Positively Regulates CD36 Expression via TCF4 and PPAR- γ in Macrophages. *Cell Phys Biochem* 2015;**35**:1289-1302.
219. Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T et al. Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nat Commun* 2011;**2**:548.
220. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 0000;**27**:5904-5912.
221. Duelli DM, Padilla-Nash HM, Berman D, Murphy KM, Ried T, Lazebnik Y. A Virus Causes Cancer by Inducing Massive Chromosomal Instability through Cell Fusion. *Curr Biol* 2007;**17**:431-437.
222. Giam M, Rancati G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Div* 2015;**10**:3.
223. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;**12**:82-88.
224. Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 2008;**272**:177-185.
225. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol cell biol* 2009;**10**:478-487.
226. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res* 2008;**68**:3645-3654.
227. Makino T, Yamasaki M, Takeno A, Shirakawa M, Miyata H, Takiguchi S et al. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2009;**101**:1298-1306.
228. Huan J, Gao Y, Xu J, Sheng W, Zhu W, Zhang S et al. Overexpression of CD9 correlates with tumor stage and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;**8**:3054-3061.

229. Zheng W, Jiang C, Li R. Integrin and gene network analysis reveals that ITGA5 and ITGB1 are prognostic in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2016;**9**:2317-2327.
230. Waisberg J, de Souza Viana L, Junior RJA, Silva SRM, Denadai MVA, Margerotto FB et al. Overexpression of the ITGAV Gene Is Associated with Progression and Spread of Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2014;**34**:5599-5607.
231. Chang ACM, Doherty J, Huschtscha LI, Redvers R, Restall C, Reddel RR et al. STC1 expression is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2015;**32**:15-27.
232. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011;**64**:415-420.
233. Cordon-Cardo C FZ, Drobnjak M, Moreno C, Eisenbach L, Feldman M. Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res* 1991;**51**:8.
234. Zeestraten ECM, Reimers MS, Saadatmand S, Dekker JWT, Liefers GJ, van den Elsen PJ et al. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *Br J Cancer* 2014;**110**:459-468.
235. Eswaran D, Suyun H. STAT3 as a Central Regulator of Tumor Metastases. *Curr Mol Med* 2009;**9**:626-633.
236. Saini U, Naidu S, ElNaggar AC, Bid HK, Wallbillich JJ, Bixel K et al. Elevated STAT3 expression in ovarian cancer ascites promotes invasion and metastasis: a potential therapeutic target. *Oncogene* 2017;**36**:168-181.
237. Bister VO, Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Uria J, Lohi J, Puolakkainen P et al. Differential Expression of Three Matrix Metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in Normal and Inflamed Intestine and Colon Cancer. *Dig Dis Sci* 2004;**49**:653-661.
238. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 2000;**192**:1027-1034.
239. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006;**203**:883-895.
240. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunol* 2012;**1**:1223-1225.
241. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008;**27**:5932-5943.
242. Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Campbell FM, Crosbie LC. Arachidonic acid uptake by human platelets is mediated by CD36. *Platelets* 1996;**7**:291-295.
243. Ibrahimi A, Abumrad N. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; **5**:139-145.
244. Martin C, Chevrot M, Poirier H, Passilly-Degrace P, Niot I, Besnard P. CD36 as a lipid sensor. *Physiol Behav* 2011;**105**:36-42.
245. Jay AG, Chen AN, Paz MA, Hung JP, Hamilton JA. CD36 Binds Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL) in a Mechanism Dependent upon Fatty Acid Binding. *J Biol Chem* 2015;**290**:4590-4603.
246. Casey SC, Amedei A, Aquilano K, Benencia F, Bhakta D, Boosani CS et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer biol* 2015;**35**:S199-S223.
247. Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:709-721.

248. Yu M, Jiang M, Chen Y, Zhang S, Zhang W, Yang X et al. Inhibition of macrophage CD36 expression and cellular oxLDL accumulation by tamoxifen-A PPAR γ dependent mechanism. *J Biol Chem* 2016;**291**:16977-16989.
249. Benn M, Tybjærg-Hansen A, Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Low-Density Lipoprotein Cholesterol and the Risk of Cancer: A Mendelian Randomization Study. *J Natl Cancer Inst* 2011;**103**:508-519.
250. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 2014;**6**:1670-1690.
251. Yuan A, Hsiao Y-J, Chen H-Y, Chen H-W, Ho C-C, Chen Y-Y et al. Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Sci Rep* 2015;**5**:14273.
252. Makita N, Hizukuri Y, Yamashiro K, Murakawa M, Hayashi Y. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int Immunol* 2015;**27**:131-141.
253. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014;**513**:559-563.
254. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;**49**:1603-1616.
255. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol* 2012;**2012**:21.